

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

L'ACTION CARDIOMYOGÉNIQUE DE L'OCYTOCINE

THÈSE
PRÉSENTÉE
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU DOCTORAT EN BIOLOGIE

PAR
BOGDAN ALEXANDRU DANALACHE

MAI 2006

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

Dédicace,

A ma famille:

Amalia, mon épouse et Alexandru Peter, notre fils.

Motto:

"Le coeur des créatures est la fondation de la vie, le prince de tout, le soleil de leur microcosme, d'où toute la vigueur et la force coulent."

William Harvey (1578 - 1657) - Anatomie sur le mouvement du coeur et du sang dans les animaux, 1628.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mes directrices de recherche, Dre Joanne Paquin, de l'Université du Québec à Montréal, et Dre Jolanta Gutkowska, de l'Université de Montréal, pour l'intérêt qu'elles ont manifesté à mon égard et les encouragements soutenus qui m'ont aidé à réaliser ce travail, où s'exprime le résultat de plusieurs années de recherches.

Je voudrais d'abord remercier ma directrice, Dre Paquin pour l'amabilité avec laquelle elle m'a accueillie dans son laboratoire, pour avoir accepté de diriger mes travaux de recherche, pour ses idées, ses conseils, sa disponibilité, son attitude encourageante tout au long de la thèse. J'apprécie les longues heures qu'elle a passées à lire et à relire les versions de cette thèse. Son aide, lors de la rédaction de cette thèse, a été particulièrement précieuse. Je veux aussi souligner ma reconnaissance pour le fait qu'elle a toujours été prête à faire les bonnes remarques et des critiques positives.

Je tiens à témoigner particulièrement ma reconnaissance à Dre Jolanta Gutkowska pour le temps et la patience qu'elle m'a accordés tout au long de ces années, pour avoir cru en mes capacités, pour tout l'intérêt qu'elle a porté à mon sujet. Avec une sagacité bienveillante, son oeil critique m'a été très précieux pour structurer le travail. Ses commentaires, conseils et suggestions constructives ont été fort judicieux et appréciés.

Mes plus sincères remerciements vont également à Dr Marek Jankowsky et à Dre Suhayla Mukaddam-Daher. Leurs commentaires scientifiques et leurs conseils m'ont permis de clarifier ma rédaction et m'ont donné des pistes de réflexion. Mes remerciements vont aussi aux Drs Diana Averill, Mircea-Alexandru Mateescu et Ryszard Grygorczyk pour m'avoir permis d'utiliser des instruments de leur laboratoire. Je voudrais remercier deux amis. Tout d'abord Dr Donghao Wang qui a su éveiller en moi une véritable passion pour

l'instrumentation de biologie moléculaire. Puis Dr Ahmed Menaouar, pharmacologue pluridisciplinaire et passionné, pour ses nombreux conseils techniques au laboratoire. Les deux m'ont fait de bons commentaires scientifiques. J'ai beaucoup apprécié le geste d'amitié de Dr Marius Gangal. Je tiens également à remercier Dre Isabel Laplante qui a toujours été disponible pour des discussions scientifiques, particulièrement sur les cellules P19.

Cela a été pour moi un privilège de rencontrer Dr Samuel M. McCann et Dr Mieczyslaw Marcinkiewicz, et je remercie les Dres Christine L Mummery et Jennifer C. Moore pour le don de cellules P19Cl6-GFP. Je leur exprime ma sympathie et leur souhaite beaucoup de bien. Un grand merci aux deux équipes de laboratoire pour leur support technique indispensable. Je remercie également les membres de mon comité d'encadrement, Drs. Robert Moreau et Catherine Jumarie, pour avoir pris le temps de juger avec soin ma proposition de recherche, pour leurs conseils sur cette proposition et leurs encouragements. Mes plus chaleureux remerciements s'adressent aussi aux membres du jury qui ont accepté de juger ce travail. Je remercie enfin le FQRNT et la Fondation de l'UQAM pour l'octroi de bourses d'études fort appréciées.

Je remercie ma famille, je voudrais également souligner la participation de Amalia, mon épouse, et Alexandru Peter, notre fils, pour leur soutien moral qu'ils m'auront fourni tout au long de la réalisation de ces travaux.

TABLE DES MATIÈRES

Liste de sigles et de l'abréviation.....	x
Résumé de la thèse	xii

CHAPITRE I :

Introduction générale

1.1. Découverte et aspects structuraux et fonctionnels de l'ocytocine (OT)	
a) Découverte de OT.....	1
b) Structure de OT.....	2
c) Biosynthèse et sécrétion de OT.....	4
d) Actions physiologiques et mécanismes d'action de OT.....	6
1.2. Récepteur de OT (OTR)	
a) Structure et expression de OTR.....	9
b) Aspects moléculaires de l'action de OT et de son récepteur	10
1.3. Aspects développementaux de OT et OTR.....	13
1.4. NO/NOS dans la fonction et le développement du cœur.....	15
1.5. Le modèle de différenciation cellulaire P19.....	19
1.6. Présentation de quelques marqueurs cellulaires généraux et phénotypiques	
a) SSEA-1.....	22
b) GATA-4.....	22
c) MHC.....	23
d) DHPR.....	24
e) ANP.....	26
f) Rhodamine - marqueur général.....	27
1.7. Hypothèse et objectifs spécifiques.....	27

Chapitre II :

Le système OT/OTR induit la différenciation de cellules souches embryonnaires P19 en cardiomyocytes

2.1. Explication de la contribution.....	29
2.2. Résumé.....	29
2.3. Abstract.....	33
2.4. Introduction.....	34
2.5. Materials and Methods.....	36
2.6. Results.....	40
2.7. Discussion.....	43
2.8. References.....	46
2.9. Figures.....	50

Chapitre III :

L'ocytocine dans l'ontogénèse cardiaque

3.1. Explication de la contribution.....	58
3.2. Résumé.....	58
3.3. Abstract.....	61
3.4. Introduction.....	62
3.5. Materials and Methods.....	64
3.6. Results.....	68
3.7. Discussion.....	71
3.8. References.....	75
3.9. Figures.....	79

Chapitre IV :

La signalisation de l'oxyde nitrique dans la cardiomyogénèse médiée par l'ocytocine

4.1. Explication de la contribution.....	88
4.2. Résumé.....	88
4.3. Abstract.....	91
4.4. Introduction.....	92
4.5. Materials and Methods.....	94
4.6. Results.....	97
4.7. Discussion.....	103
4.8. References.....	108
4.9. Figures.....	113

Chapitre V :

Les peptides ocytocine-Gly-Lys-Arg, -Gly-Lys et -Gly sont cardiomyogéniques dans les cellules souches P19

5.1. Explication de la contribution.....	127
5.2. Résumé.....	127
5.3. Abstract.....	129
5.4. Introduction.....	131
5.5. Materials and Methods.....	133
5.6. Results.....	135
5.7. Discussion.....	137
5.8. References.....	139
5.9. Figures.....	141

Chapitre VI :**Discussion générale**

6.1. Le système OT/OTR dans la cardiomyogenèse et ses relations possibles avec le DMSO et le RA.....	148
6.2. L'implication de NO dans l'action cardiomyogénique de OT/OTR...	153
6.3. Les peptides OT-X sont cardiomyogéniques	154
6.4. Impact et perspectives.....	156
6.5. Conclusion générale.....	159

Chapitre VII :

Références bibliographiques.....	160
Annexe: Brevet.....	178

LISTE DE SIGLES ET DE L'ABREVIATION:

1400W	= N-(3-[aminométhyl]benzyl)acétamidine
aa	= acides aminés
ACE	= enzyme de conversion de l'angiotensine
AMPc	= adénosine monophosphate cyclique
ANP	= peptide natriurétique auriculaire
ACV	= accidents cérébrovasculaires
BSA	= albumine sérique bovine
CM	= cardiomyocytes
CPD	= carboxypeptidase D
DAG	= 1,2-diacylglycérol
DHPR	= récepteur des dihydropyridines
DMSO	= diméthylsulfoxyde
EB	= corps embryoïdes
EC	= carcinome embryonnaire
eNOS	= NOS endothéliale
EX 1-3	= exon 1-3
FACS	= cytométrie de flux
GATA-4	= facteur de transcription cardiaque reconnaissant et se liant à la séquence d'ADN WGATAR (W = A/T, R = A/G)
GC-A	= guanylyl cyclase A
GFP	= protéine fluorescente verte
GMPc	= guanosine monophosphate cyclique
HUVEC	= cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine
iNOS	= NOS inducible
IP3	= inositol-1,4,5-triphosphate
IRAP	= aminopeptidase régulée par l'insuline
kb	= kilobase
kDa	= kiloDalton
L-NAME	= S-nitroso-N-acétylpénicillamine
MAPK	= <i>Mitogen-Activated Proteine Kinase</i> (protéine kinase activée par des mitogènes)
MEF2C	= <i>myocyte enhancer factor 2C</i> (facteur-2C activateur de myocytes)
MEM	= milieu essentiel minimum
MHC	= chaîne lourde de la myosine cardiaque
NKx2,5	= <i>Nirenberg & Kim xenopus 2,5 cardiac-specific homeobox protein</i> (protéine à boîte homéotique cardiaque)
nNOS	= NOS neuronale
NO	= oxyde nitrique
NOS	= NO synthases
NP-I	= neurophysine I
ODQ	= 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one
OT	= ocytocine

OTR	= récepteur de OT
OT-X	= ocytocine-Gly-Lys-Arg, -Gly-Lys, -Gly
pb	= paire de base
PBS	= <i>phosphate buffered saline</i> (tampon phosphate salin)
PCR	= <i>polymerase chain reaction</i> (réaction de polymérisation en chaîne)
PIP2	= phosphatidylinositol-4,5-biphosphate
PKC	= phosphokinase C
P-LAP	= leucine aminopeptidase placentaire
PLC	= phospholipase C
RA	= acide rétinoïque
RE	= réticulum endoplasmique
RT-PCR	= <i>reverse transcriptase polymerase chain reaction</i> (réaction de polymérisation en chaîne par retro-trascription)
RYR	= récepteur de la ryanodine
sGC	= guanylylcyclase soluble
SNAP	= N-acétyl-3-(nitrosothio)-D-valine
SSEA-1	= <i>stage-specific embryonic antigen</i> (antigène embryonnaire spécifique de stade)
T3	= hormone thyroïdienne
TBS	= <i>tris buffered saline</i> (tampon Tris salin)
TSH	= <i>thyroid-stimulating hormone</i> (hormone stimulatrice de la thyroïde)
V1a	= récepteur 1a de VP
V1b	= récepteur 1b de VP
V2	= récepteur 2 de VP
VP	= vasopressine

Résumé

Le développement du cœur est un processus complexe qui commence par la différenciation de cellules souches embryonnaires en cellules mésodermiques et endodermiques qui donnent naissance à un cœur primitif et finalement, après plusieurs étapes, à un cœur adulte avec des myocytes développés, définitivement contractiles et incapables de se multiplier dans des conditions normales. Malgré d'importantes découvertes sur le développement du cœur, nous connaissons encore imparfaitement les mécanismes qui règlent la cardiogénèse, depuis la différenciation en cellules cardiaques jusqu'à la formation de l'organe complet. L'hormone ocytocine (OT) a été longtemps connue comme une hormone du système reproducteur féminin impliquée dans l'accouchement et l'allaitement. On sait maintenant que OT est produite chez les deux sexes et qu'elle a un rôle très large dans la reproduction ainsi que des rôles en dehors de la reproduction incluant le comportement sexuel, les liens sociaux et parentaux, la cognition, la mémoire, et la prise de nourriture et d'eau. L'hypothalamus est une source importante de OT, comme de son récepteur OTR. Cependant l'hormone est aussi synthétisée dans d'autres tissus dont le cœur et le système vasculaire. Dans le cœur, OT stimule la sécrétion du peptide natriurétique auriculaire (ANP) - une hormone à action diurétique, natriurétique et vasorelaxante. Les actions de OT sont conduites par son récepteur OTR selon des mécanismes de signalisation qui demeurent incomplètement connus mais pourraient impliquer l'oxyde nitrique (NO). Des études préliminaires menées chez le rats ont montré des niveaux élevés de OT dans le cœur foetal et de nouveau-nés et des niveaux bas dans l'organe adulte, suggérant un rôle de OT dans le développement du cœur. D'autre part, il avait été rapporté que OTR est exprimé dans les oocytes, suggérant une action précoce de OT/OTR dans le développement embryonnaire. Nous avons donc formulé comme hypothèse que OT pourrait avoir un rôle dans la différenciation cardiaque. Pour tester cette hypothèse nous avons utilisé le modèle de cellules souches embryonnaires P19 qui sont des cellules dérivées d'un tératocarcinome embryonnaire de souris.

Les cellules P19 traitées avec 10^{-7} M OT pendant les 4 jours d'agrégation ont donné naissance à des colonies de cellules battant de façon rythmique. OT a stimulé la production de colonies battantes de façon plus précoce que ne l'a fait le diméthylsulfoxyde (DMSO) utilisé à une concentration de 0,5%. Les cultures ont exhibé une augmentation de l'ARNm d'ANP, avaient des mitochondries abondantes puisqu'elles ont absorbé fortement la rhodamine123, et ont exprimé la chaîne lourde de la myosine sarcomérique et le récepteur de la dihydropyridine- α 1, confirmant un phénotype de cardiomyocytes. De plus, OT aussi bien que DMSO ont augmenté la protéine OTR et l'ARNm d'OTR. OTA, un antagoniste de OT, a complètement inhibé la formation de cardiomyocytes dans les cultures induites par OT. Donc, OT induit la cardiomyogénese de cellules P19 et cela, par un mécanisme dépendant de OTR. OTA a aussi inhibé la

cardiomyogénèse induite par 10^{-7} M et 10^{-8} M d'acide rétinoïque (RA) et 0.5% DMSO. OT et OTR sont donc impliqués dans l'action cardiomyogénique du DMSO et de RA, des inducteurs cardiaques déjà connus. L-NAME, un inhibiteur des synthèses de l'oxyde nitrique NO (NOS), a inhibé la formation de colonies cellulaires battantes induites par OT. SNAP, un générateur de NO, a partiellement renversé cet effet inhibiteur de L-NAME. L-NAME a aussi diminué les ARNm de GATA-4, eNOS et ANP induits par OT. Les composés 1400W (un autre inhibiteur de NOS) et ODQ (un inhibiteur de la guanylate cyclase soluble - cible des NOS) ont aussi réduit l'action cardiomyogénique de OT. NO est donc impliqué dans la différenciation cardiaque induite par OT. L-NAME, 1400W et ODQ ont par eux-mêmes une faible activité cardiomyogénique, soulevant la possibilité que les niveaux de base de NO mettent une barrière à la différenciation cellulaire. Nous avons investigué si les formes biosynthétiques C-terminalement allongées de OT (les OT-X: OT-Gly-Lys-Arg, OT-Gly-Lys et OT-Gly) sont impliquées dans la génération de cardiomyocytes. Nos études ont révélé pour la première fois la fonctionnalité des OT-X et leur action cardiomyogénique.

L'ensemble des résultats permet donc de postuler un rôle de OT et de ses intermédiaires biosynthétiques dans le développement du cœur, et souligne le potentiel thérapeutique de ces peptides dans le traitement de maladies cardiaques qui sont plus fréquentes avec le vieillissement de la population. Des traitements avec ces molécules pourraient promouvoir la cardiomyogénèse *in situ* et la régénération d'un cœur blessé. La compréhension des mécanismes de différenciation cardiaque appuiera les applications thérapeutiques.

Mots clés : ocytocine, récepteur de l'ocytocine, cellules souches embryonnaires P19, cardiomyocytes, cardiomyogénèse, oxyde nitrique, cardiologie

CHAPITRE I

INTRODUCTION GENERALE

À l'aide du modèle P19 de cellules souches embryonnaires de souris, nous avons investigué le rôle possible de l'ocytocine (OT) dans la différenciation de ces cellules en cardiomyocytes. Pour camper le contexte de la recherche, nous présenterons dans cette introduction un aperçu des connaissances actuelles sur la structure, les rôles et l'expression de OT et de son récepteur OTR dans l'organisme animal adulte et en développement. Nous donnerons aussi des informations sur le rôle de l'oxyde nitrique (NO) et des synthases de l'oxyde nitrique (NOS) en relation avec la fonction et le développement du coeur. Finalement, après une présentation du modèle de différenciation cellulaire P19 et de marqueurs phénotypiques utilisés dans nos travaux, nous exposerons l'hypothèse et les objectifs spécifiques de cette thèse.

1.1. Découverte et aspects structuraux et fonctionnels de l'ocytocine (OT)

a) Découverte de OT

Les hormones peptidiques libérées par les cellules endocrines peuvent agir sur des tissus ou cellules situés à courte comme à longue distance du lieu de libération. Oliver et Schafer (1895) (*voir* Welbourn RB, 1992) ont attiré l'attention sur le rôle de l'hypophyse en montrant que l'injection intraveineuse, chez les chiens, d'extraits hypophysaires totaux de boeuf entraînait un effet hypertensif. Trois ans plus tard, W.H. Howell montra que cet effet hypertensif n'était obtenu qu'avec des extraits hypophysaires du lobe postérieur de l'hypophyse. L'activité ocytocique (*gr. oxutoki*,

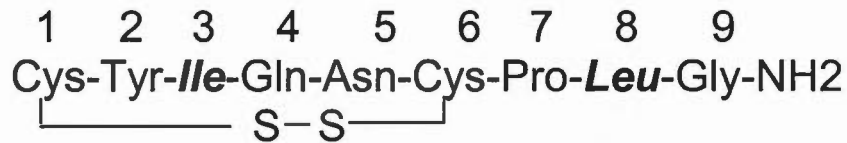
okutokios, *okus*: rapide ; *tokos*: accouchement) a été découverte en 1906 par H. H. Dale (prix Nobel 1936) qui a montré que l'injection intraveineuse d'extraits d'hypophyse chez des chattes induit des contractions utérines. Les premiers essais cliniques (1909) avec des extraits d'hypophyse postérieure pour l'induction de l'accouchement ont été faits par B. Bell en Angleterre (den Hertog et al, 2001).

En 1910, Ott et Scott ont observé que ces extraits augmentent la sécrétion du lait chez la chèvre. En 1913, Von den Velden a observé l'effet antidiurétique de l'administration d'extraits hypophysaires. Cette découverte a permis la mise au point d'une méthode clinique pour contrôler la polyurie (une augmentation anormale de la production d'urine et d'absorption de liquide) associée au diabète insipide. Donc, les extraits d'hypophyse postérieure ont trois effets principaux : les effets hypertensif, ocytocique, et antidiurétique. En 1928, deux substances ont été séparées sous forme cristalline par Kamm, l'une nommée alpha-hypophamine ocytocique (actuellement OT), et l'autre, la beta-hypophamine vasopressive (actuellement, la vasopressine ou VP). Les structures de OT et de VP, qui sont très similaires, ont été élucidées par Du Vigneaud (1953). En 1955, ce chercheur a reçu le prix Nobel non seulement pour la détermination de la séquence en acides aminés des deux hormones hypophysaires mais aussi pour avoir réussi la synthèse de OT (première hormone artificielle), (Pierce JG et al, 1952).

b) Structure de OT

L'ocytocine OT (aussi appelée *pitocine*) est produite par le système hypothalamus–hypophysaire et est reconnue comme une hormone reproductrice féminine, stimulant les contractions utérines lors de l'expulsion du fœtus et l'éjection du lait maternel. L'OT est un nonapeptide dont la séquence en acides aminés est très similaire à celle de la VP (Fig.1.1). Deux résidus de cystéine (Cys₁ et Cys₆) présents dans la séquence sont reliés par un pont disulfure. Les trois acides aminés C-terminaux de OT sont responsables de plusieurs effets hormonaux (Gimpl et Fahrenholz, 2001).

Ocytocine (OT)



Vasopressine (VP)

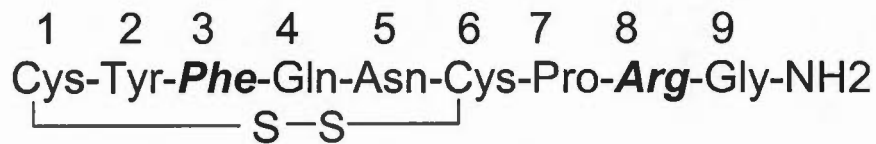


Fig. 1.1. Structure de OT et de VP. Les deux hormones sont structuralement similaires, différant seulement par 2 acides aminés en position 3 et 8. (*Adapté de Du Vigneaud et al, 1953*)

Phylogénétiquement anciennes chez les mammifères, les molécules de OT et VP proviennent d'une molécule ancestrale commune. OT et VP sont codées par deux gènes différents qui sont placés sur le même chromosome, séparés par un segment d'ADN long de 3,5 kilobases (kb) chez la souris, 11 kb chez le rat, et 8 kb chez l'homme, mais orientés dans des directions transcriptionnelles opposées (Fig. 1.2).

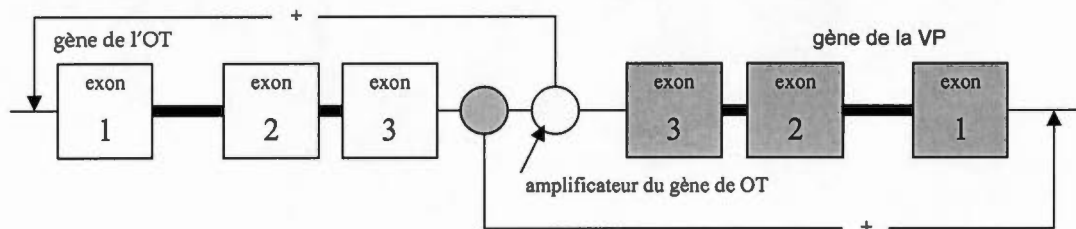


Fig. 1.2. Structure des gènes de l'OT et de la VP (*Adapté de Gimpl et Fahrenholz, 2001*).

Les gènes de OT et de la VP sont très similaires au niveau de l'organisation des exons et des introns, chacun possédant trois exons séparés par deux introns. La

plus grande différence entre les gènes de l'OT et la VP se trouve dans la séquence du promoteur qui contrôle leur transcription. Le promoteur de l'OT humaine et de rat pourrait être stimulé par l'oestrogène, l'hormone thyroïdienne (THRalpha) et l'acide rétinoïque (RA) dans une variété de cellules (Gimpl et al, 2001). OT est d'abord synthétisée sous forme d'une protéine précurseur appelée *pré-pro-OT*. La correspondance entre les exons et la structure du précurseur est montrée à la Fig. 1.3.

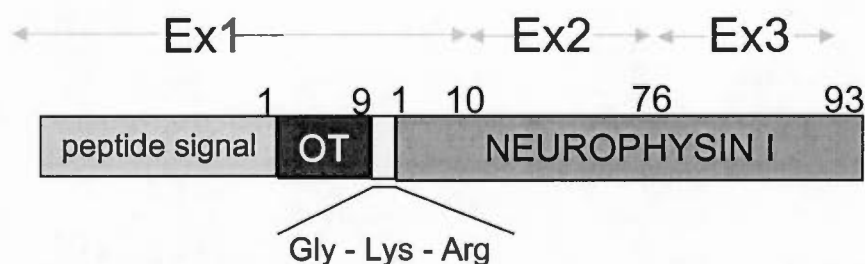


Fig. 1.3. Relation des exons de la pré-pro-OT. Le premier exon (Ex1) de l'OT code les 19 acides aminés du peptide signal, les 9 acides aminés de la séquence de l'OT, la séquence GKR qui sépare OT de la neurophysine I (NP-I), et les 9 acides aminés de la région N- terminale de la NP-I. Le deuxième exon (Ex2) code pour la région centrale de la NP-I (67 aa), et le troisième exon (Ex3) code la portion C- terminale de la NP-I (17 aa) (*Adapté de Sausville et al, 1985*).

c) Biosynthèse et sécrétion d'OT

L'OT est produite dans l'hypothalamus plus précisément dans les corps cellulaires de neurones magnocellulaires localisés dans les noyaux supraoptique et paraventriculaire. Elle est d'abord synthétisée sous forme d'un précurseur qui contient un peptide signal ainsi que les séquences de OT et de la neurophysine-I séparées par trois acides aminés Gly-Lys-Arg. Le clivage du peptide signal transforme la pré-pro-OT en pro-OT. La pro-OT est convertie en OT mature par l'action successive d'une **prohormone convertase**, d'une carboxypeptidase de type

B (probablement la *carboxypeptidase E*) et d'une *peptidylglycine α -amidating monooxygenase* ou enzyme d'amidation (Fig. 1.4).

Le peptide OT bioactif est entreposé dans la glande postérieure de l'hypophyse (nommée aussi *glande pituitaire postérieure*). Les corps cellulaires de neurones hypothalamiques sont capables de synthétiser OT ou VP qu'ils entreposent dans des vésicules de sécrétion appelées granules de sécrétion. Ces granules cheminent (par transport intracellulaire) ensuite dans la fibre nerveuse (axone) jusqu'aux terminaisons nerveuses de l'hypophyse postérieure. Ils fusionnent avec la membrane synaptique et s'ouvrent ainsi vers l'extérieur en déversant leur contenu à l'extrémité de l'axone, au niveau de la synapse dans la circulation générale (action endocrine). L'hormone produite dans d'autres tissus périphériques peut agir de façon paracrine, c'est-à-dire sur les cellules voisines.

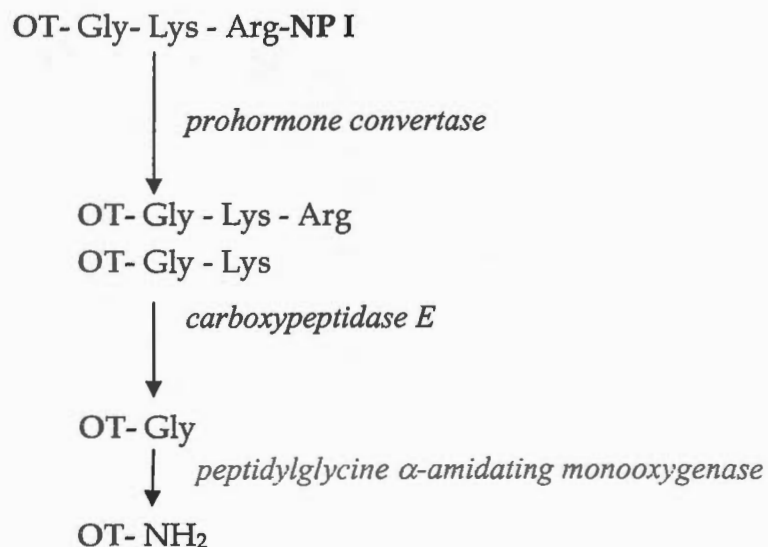


Fig. 1.4. Biosynthèse de OT. La conversion de la prohormone OT-Gly₁₀-Lys₁₁-Arg₁₂-NP-I en OT et en neurophysine I (NP-I) est effectuée par une endopeptidase de type prohormone convertase qui clive le lien Arg-NP I et peut-être le lien Lys-Arg. Ensuite, une carboxypeptidase de type B (probablement la carboxypeptidase E) clive l'Arg₁₂ et la Lys₁₁. L'intermédiaire final OT-Gly est amidé par l'enzyme d'amidation (mono-oxygénase α -amidante de peptidylglycine) pour produire l'OT active prête à être sécrétée dans le milieu extracellulaire (Adapté de Altstein et Gainer, 1988; Gainer et al, 1985).

Pendant le transport intracellulaire, les deux hormones OT et VP sont chacune liées à une protéine de transport d'un poids moléculaire de 10 kDa, nommée neurophysine (NP). Celle-ci est une protéine qui forme un complexe dimérique soit avec VP, soit avec OT (Gainer et al, 1988 ; Ando et al, 1988).

La sécrétion de OT hypothalamique est réalisée par une dépolarisation membranaire qui provoque un influx de Ca^{2+} intracellulaire, en inhibant l'activité de l'enzyme ATPase dépendante du Ca^{2+} , Mg^{2+} . La biosynthèse est augmentée par stimulation du col utérin, du vagin, du sein, et est diminuée par l'éthanol (effet tocolytique). Le niveau plasmatique normal de OT est très bas (environ 1-10 pg/ml) et se situe pas loin de la limite de détection par l'immunodosage (Ohlsson et al, 2004).

Chez les humains, la demie-vie de OT circulante est d'environ 3 à 5 minutes. L'hormone est métabolisée au niveau du foie, du rein, des glandes mammaires et de l'utérus, pendant la grossesse. OT est dégradée en quelques minutes par une enzyme plasmatique, l'ocytocinase. Cette enzyme est aussi présente dans le placenta, d'où son autre nom *placental leucine aminopeptidase* (P-LAP) (Fabian et al, 1969).

d) Actions physiologiques et mécanismes d'action de OT

OT est le plus puissant des agents utérotoniques connus. Elle est utilisée pour induire et stimuler les contractions utérines lors de l'accouchement ou pour provoquer l'avortement, en agissant sur le muscle lisse de l'utérus. OT est utilisée pour le traitement prophylactique des hémorragies du post-partum (un facteur important de morbidité et de mortalité à l'hôpital) et récemment les prostaglandines sont aussi utilisées (Gulmezoglu et al, 2001; 2004). Le mécanisme utérotonique qui transduit le signal hormonal a été élucidé au début des années 1980 (Fuchs et al, 1984). OT, liée à son récepteur, induit une augmentation du taux intracellulaire d'inositol-1,4,5-triphosphate (IP_3) qui entraîne une libération, dans le cytoplasme, des ions Ca^{2+} séquestrés dans le réticulum endoplasmique (RE). Les étapes de

cette libération sont les suivantes. OT stimule l'activité de la phospholipase C (PLC) et la production d'IP₃ en se fixant à son récepteur couplé à une protéine G. La PLC hydrolyse le phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP₂) pour générer le 1,2-diacylglycérol (DAG) qui reste ancré dans la membrane et IP₃ hydrosoluble. L'IP₃ se lie à des canaux calciques du RE permettant aux ions Ca²⁺ de passer du RE au cytosol et d'induire ainsi une contraction. L'IP₃ est hydrolysé en inositol-1,4-biphosphate, molécule qui n'affecte pas l'efflux d'ions Ca²⁺.

La fonction physiologique la mieux établie de OT est durant l'allaitement puisque c'est la seule substance naturelle connue provoquant l'éjection de lait. Elle est nécessaire pour la prolifération des alvéoles et le développement de la glande mammaire après l'accouchement (Young et al, 1998). Indirectement, via la libération de la prolactine, elle peut promouvoir la production du lait. Une stimulation mécanique de la glande mammaire transmet des impulsions électriques via les neurones afférents vers les neurones ocytocinergiques des noyaux supraoptique et paraventriculaire. Ces impulsions provoquent la dépolarisation des neurones ocytocinergiques et ainsi, l'entrée du Ca²⁺ et la sécrétion de OT dans le sang. L'OT circulant va se lier à ses récepteurs présents dans les cellules myoépithéliales des glandes mammaires. La contraction de ces cellules provoque la compression des alvéoles et permet l'éjection du lait (Mena et al, 1978). Le niveau d'OT circulant augmente chez les femmes enceintes comparativement à celles qui ne le sont pas (De Geest et al, 1985).

L'OT hypothalamique n'est pas essentielle à l'initiation ou au maintien des contractions utérines. L'utérus lors de l'accouchement satisfait ses besoins par une autoproduction de l'hormone (Lefebvre et al, 1992, Mitchell et al, 1998). Les effets de OT sont accentués par les œstrogènes qui produisent la chute du potentiel membranaire de repos et augmentent le nombre de récepteurs pour OT sur les cellules utérines. On note une augmentation remarquable de l'ARNm des récepteurs utérins durant l'accouchement (Wu et al, 1996). OT n'est pas essentielle à l'accouchement puisqu'un accouchement normal peut avoir lieu chez le rat et l'humain en l'absence d'OT circulante causée par une glande hypophysaire non

fonctionnelle (Lefebvre et al, 1992), ou par la présence d'ocytocinase (P-LAP) qui dégrade OT.

Pendant la dernière décennie, une variété d'études ont révélé que OT a des rôles en dehors de l'accouchement et de l'allaitement. D'abord, OT est produite chez les deux sexes. En effet, mâles et femelles ont des concentrations équivalentes d'OT dans le plasma, ont un nombre semblable de neurones ocytocinergiques dans l'hypothalamus, et ces neurones répondent aux mêmes stimuli. Les souris OT^{-/-}, dont le gène OT a été aboli (*knock-out*), sont capables de parturition indiquant qu'OT n'est pas essentielle pour ce processus (Young et al, 1998; Nishimori et Matzuk, 1996). Ces souris connaissent cependant certains changements physiologiques: de l'hypotension et une augmentation du gain baroréflexe à la pression sanguine suggérant qu'OT est impliquée dans le maintien du tonus artériel (Michellini et al, 2003), des perturbations du réflexe d'éjection de lait (Nishimori et et Matzuk, 1996 ; Wagner et al, 1997) et des perturbations des fonctions de la mémoire sociale (Winslow et Insel, 2002). Il est possible que VP (qui est encore produit par des souris OT^{-/-}) puisse assumer certaines fonctions d'OT. En outre, peuvent exister des mécanismes de compensation.

Il est maintenant clair que OT n'est pas produite exclusivement par l'hypothalamus mais est aussi synthétisée et retrouvée dans différents tissus et fluides dont ceux du système reproducteur femelle (utérus, placenta, ovaire et corpus luteum) et du système reproducteur masculin (testicules, épидидyme et prostate), dans les glandes surrénales, la glande pinéale, le thymus, le liquide céphalo-rachidien et le liquide amniotique (Ang et Jenkins, 1984; Argiolas et al, 1990; Dogterom et al, 1977; Guaquelin et al, 1988; Gimpl et Fahrenholtz, 2001). Il y a de nos jours un consensus sur l'idée que OT est impliquée dans le comportement sexuel, les liens sociaux et parentaux, la cognition, la mémoire, et la prise de nourriture et d'eau (Kosfeld et al, 2005).

En utilisant le rat, l'équipe du Dr. Gutkowska a montré l'existence d'un système complet OT/OTR dans le cœur et le système cardio-vasculaire. Dans le cœur, OT et son récepteur ont un rôle régulateur de la pression sanguine en induisant la libération du peptide natriurétique auriculaire (ANP), une hormone diurétique,

natriurétique et vasorelaxante. La libération d'ANP est inhibée par un antagoniste spécifique de OT (Gutkowska et al, 1997). Dans le coeur isolé et perfusé, OT exerce aussi des actions inotropiques et chronotropiques négatives (Favaretto et al, 1997; Mukaddam-Daher et al, 2001).

1.2. Récepteur de OT

a) Structure et expression de OTR

Jusqu'à maintenant, un seul récepteur d'OT (OTR) a été caractérisé dans plusieurs espèces animales (Kubota et al, 1996) (Fig.1.5).

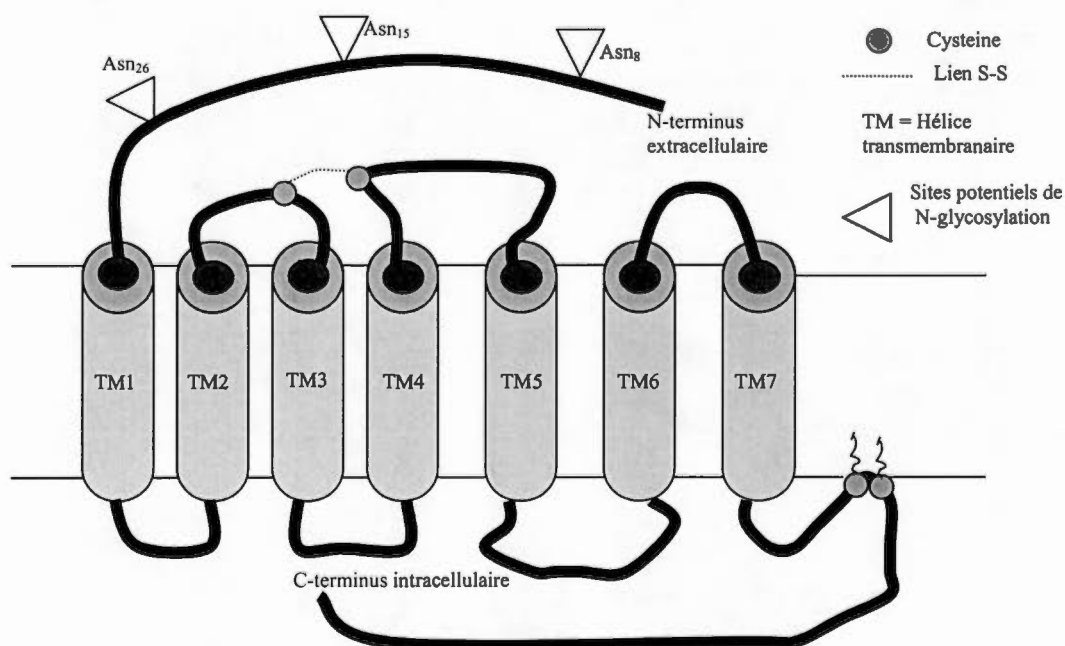


Fig. 1.5. Structure de OTR (*Adapté de Zingg et Laporte, 2003*)

OTR est associé à une classe de type 1 de protéines G et possède 7 domaines transmembranaires très bien conservés à travers les espèces (Verbalis et al, 1999). Les premières études de marquage par photo-affinité et d'analyse électrophorétique

pour la protéine OTR purifiée du myomètre de lapin montrent un poids moléculaire de 65 kDa (Hinko et al, 1992).

OTR est présent dans les systèmes reproducteurs femelle (utérus, placenta, ovaire, corpus luteum et glande mammaire) et mâle (testicules, cellules de Leydig, épидидyme et prostate), l'hypophyse, le thymus, le cerveau, le rein, le cœur, l'endothélium vasculaire, les muscles lisses des vaisseaux sanguins et du myomètre, les adipocytes, le pancréas, les glandes surrénales, les ostéoblastes (Gimpl et Fahrenholz, 2001). Il est aussi exprimé dans des lignées cellulaires et tumorales (Gimpl et Fahrenholz, 2001). La présence d'OTR a été démontrée dans les quatre compartiments du cœur de rat (Jankowski et al, 1998). La VP a trois récepteurs membranaires qui appartiennent comme OTR à la famille des récepteurs couplés aux protéines G : V1a, V1b et V2. Des études d'affinité (Burbach et al, 1995) ont montré que OTR a une affinité égale pour OT et VP alors que les récepteurs V1 ont une affinité trente fois plus grande pour VP que pour OT. La séquence génique du récepteur V1b montre une homologie de 45% avec la séquence de OTR, 45% avec celle de V1a et de 38% avec celle de V2.

b) Aspects moléculaires de l'action de OT et de son récepteur

Les voies de signalisation activées par OT/OTR sont encore imparfaitement connues, sauf pour l'implication du Ca^{2+} et des phosphoinositides dans l'utérus (section 1.1.d). Quelques études seulement ont proposé des modèles de transduction du signal. Sur les cellules tumorales, une action mitogénique a été décrite (Taylor et al, 1990; Petersson et al, 2002) qui impliquerait probablement le Ca^{2+} , l'oxyde nitrique (NO) et la phosphokinase C (PKC). OT peut aussi stimuler la prolifération de thymocytes, de cellules de l'épithélium de la prostate, de cellules endothéliales, de trophoblastes et de cellules de muscle lisse de l'utérus (Plecas et al, 1992; Tahara et al, 2000 ; Thibonnier et al, 1999). Un effet antiprolifératif cette fois (probablement via l'AMPc et la protéine kinase A) a été documenté dans les cellules du cancer du sein et d'autres tumeurs (Cassoni et al, 2001; Bussolati et al, 1996; Novak et al, 2000).

Un autre mécanisme proposé mais non démontré (Fig. 1.6) implique la participation de la PKC et d'une MAP kinase par analogie avec des travaux faits sur le récepteur de VP (Thibonnier et al, 1998). La liaison de l'OT à son récepteur activerait la PLC via des protéines G et ainsi la formation d'IP₃ et la libération de Ca²⁺ par le RE.

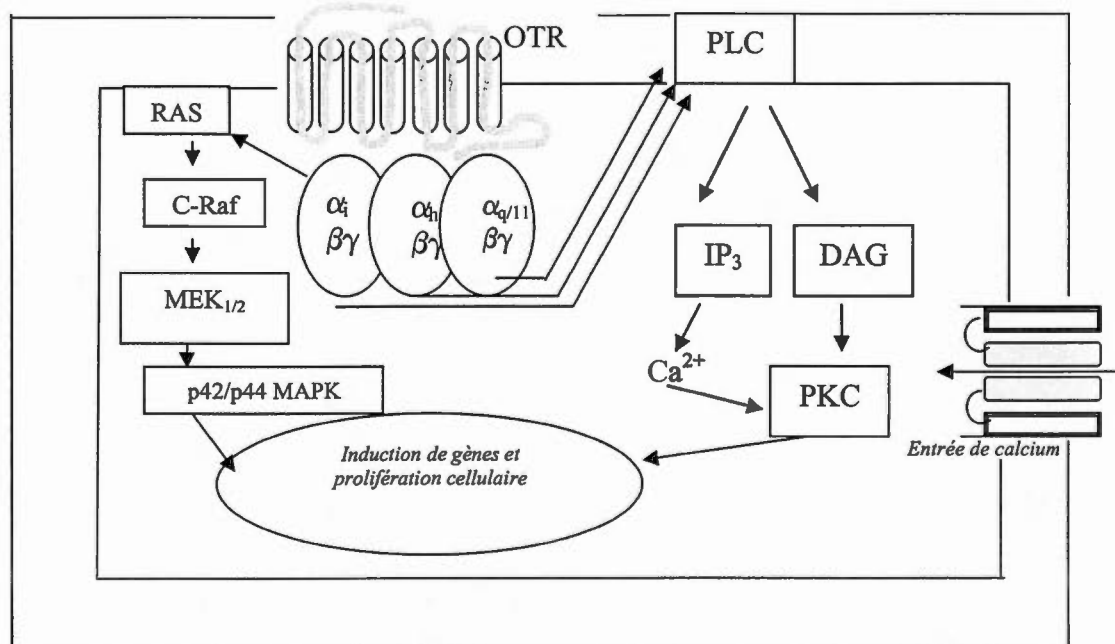


Fig. 1.6. Schéma proposé de l'activation du récepteur de OT par le groupe de Thibonnier. PLC : phospholipase C; DAG : diacylglycérol; IP₃ : inositol triphosphate-1,4,5; PKC : protéine kinase C; MAPK : « Mitogen-Activated Proteine Kinase » (Adapté de Thibonnier et al, 1998 Adv Exp Med Biol).

OTR active les 3 isoformes de la PLC-bêta via trois types de protéines G dans les cellules myométriales humaines: la Gi sensible à la toxine pertussis, la Gq/11 insensible à la toxine, et la Gh (Baek et al, 1996; Phaneuf et al, 1996). OT induit une oscillation de la concentration de Ca²⁺ intracellulaire de façon dépendante de la dose dans les cellules de myomètre humain (Burghardt et al, 1999).

Divers analogues de OT ont été synthétisés et certains sont ou pourront être utilisés en recherche et thérapeutique. Des analogues ont été préparés en enlevant à OT certains groupements fonctionnels (le groupement NH₂ de la cystine, le groupement OH de la tyrosine, les groupements carboxamides de l'asparagine, de la glutamine

et de la glycineamide, le pont disulfure). La désamino-ocytocine (Fig. 1.7) possède une activité antidiurétique cinq fois plus grande que celle de OT (Hope et al, 1961)

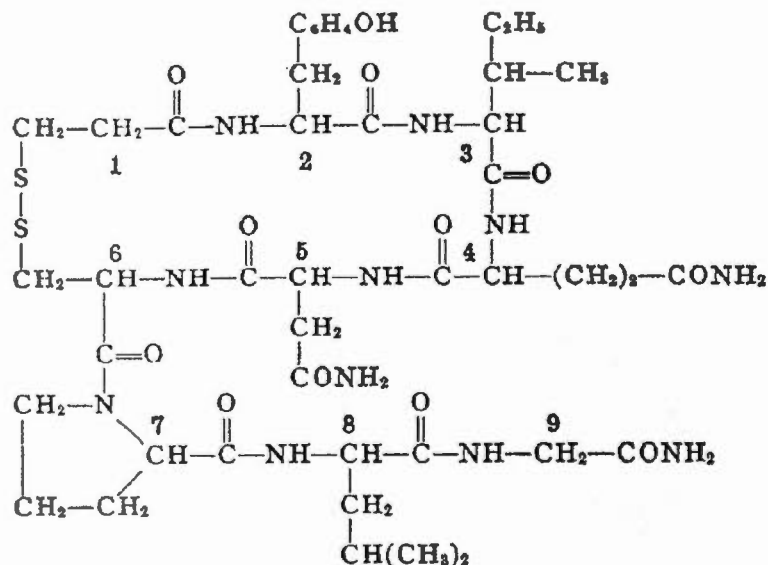


Fig. 1.7. Structure de la désamino-ocytocine (*Adapté de Hope et al, 1961*)

Dans le cœur, un premier mécanisme proposé de l'action de OT impliquerait une élévation de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire dans la voie qui mène à la libération de ANP granulaire (Fig. 1.8). L'ANP libérée se lie à ses récepteurs cardiaques (ANPr) et active la guanylate cyclase (Gc) qui génère du GMPc. Ce nucléotide conduit à une diminution de la force des contractions musculaires et une baisse de la fréquence cardiaque. OT peut ainsi agir sur l'homéostasie de l'organisme entier, en contrôlant le volume sanguin et la pression artérielle (Gutkowska et al, 1997).

Dans le cœur, la stimulation du système OT/OTR induit donc la libération de l'ANP, avec des effets inotropique (la force de contraction musculaire) et chronotropique (la fréquence des battements cardiaques) négatifs (Mukaddam-Daher et al, 2001). La perfusion d'oreillettes isolées avec OT (10^{-6} M) baisse la fréquence et la force de contraction. Ces effets sont inhibés par L-NAME, un inhibiteur de NO-synthases (NOS), indiquant que l'oxyde nitrique (NO) est impliqué dans le mécanisme de

l'action cardiaque de OT. En plus, OT induit la libération de NO dans des cellules endothéliales humaines (Thibonnier et al, 1999).

L'oxyde nitrique et les enzymes responsables de sa production, les NO-synthases (NOS), sont présentés de façon plus élaborée dans la section 1.4.

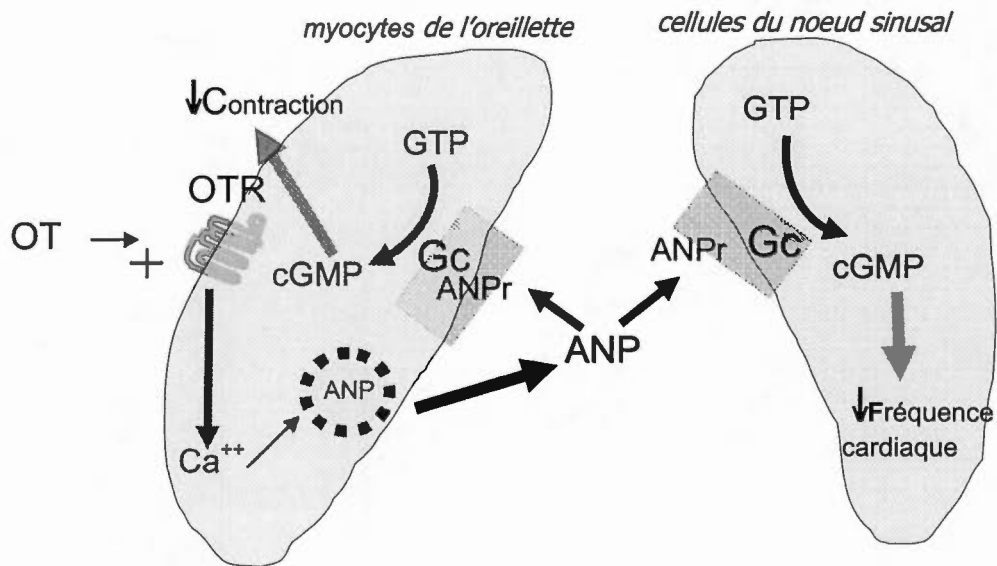


Fig. 1.8. Mécanisme proposé de l'action de OT dans la sécrétion d'ANP (*Adapté de Gutkowska et al, 1997*).

1.3. Aspects développementaux de OT et OTR

Nous ne connaissons pas encore le profil ontogénique de OT et OTR dans l'organisme entier. Le système hypothalamus/hypophyse et le cerveau ont été étudiés plus en détail parce qu'ils sont connus comme source importante de OT. Burbach et al (1980) ont étudié l'ontogénèse de OT et de VP dans le cerveau. Ils ont montré la présence des transcrits d'OT et de VP dans différents groupes de neurones dès le jour embryonnaire 15.5 (E15.5) chez la souris. L'évidence de

l'activation du système neurohypophysaire fœtal avant ou durant l'accouchement suggère la contribution du fœtus dans l'initiation de sa propre naissance par la sécrétion de OT. Chez le rat, OT apparaît dans la glande hypophysaire fœtale dès le 16^e jour de la grossesse. Sa concentration diminue entre les 16^e et 18^e jours, puis augmente (Buijs et al, 1980) et enfin diminue durant l'accouchement. L'OT fœtal contribue au taux d'hormone dans la circulation maternelle, via le placenta, puisque la concentration en OT est plus élevée dans les artères ombilicales (15-40 pg/ml) comparativement aux veines ombilicales (4-12 pg/ml) et aux veines maternelles (1-10 pg/ml). La différence entre la concentration ombilicale artérielle et veineuse permet de suggérer que l'OT est transportée de la circulation sanguine fœtale vers la circulation maternelle via le placenta. Le placenta possède aussi une activité ocytocinasique qui métabolise l'OT (Malek et al, 1996).

La détection de OT et OTR dans le cœur adulte a stimulé la poursuite d'études sur le cœur en développement. Le cœur est le premier organe qui apparaît pendant le développement de l'embryon. La différenciation et maturation de cellules cardiaques sont des processus complexes. Entre le jour gestationnel 21 et le jour post-natal 4 chez le rat, on assiste à une intense hyperplasie de cardiomyocytes causée par une prolifération élevée des cellules, laquelle est suivie d'une hypertrophie cellulaire. Au début des travaux de cette thèse, des résultats préliminaires obtenus par l'équipe du Dr. Gutkowska ont montré que les ARNm de OT et OTR étaient plus abondants dans les cœurs de nouveau-nés que dans les cœurs adultes, et l'expression élevée d'OT dans les cœurs de nouveaux-nés coïncidait avec la période d'intense hyperplasie des cardiomyocytes. Ces observations pouvaient indiquer un rôle possible de OT dans le développement du cœur. Il est intéressant de noter que ce qui se passe dans le cœur en développement est le contraire de ce qui se produit dans l'hypothalamus. En effet, dans l'hypothalamus le niveau d'OT augmente à l'âge adulte. Ces résultats apparaîtront sous leur forme finale dans le Chapitre IV de cette thèse. En relation avec une implication de OT dans le développement du cœur, une accélération de la fonction cardio-vasculaire fœtale a été montrée par administration de OT à des brebis gestantes (Shinozuka et al, 2000). Quelques études, très rares, ont rapporté l'expression de OT et/ou OTR durant l'embryogénèse. Ainsi, OT et/ou

ses intermédiaires biosynthétiques ont été détectés dans le cerveau en développement (Gainer et al, 1985; Altstein et Gainer, 1988; Chen et al, 2000; Yoshimura et al, 1996). L'ARNm de OT et de OTR a aussi été trouvé associé à des structures reliées à l'embryon précoce (oocytes fertilisés, cellules du cumulus, et blastocystes (Furuya et al, 1995)), suggérant une action précoce de OT dans le développement embryonnaire. Tout récemment, les systèmes OT/OTR et VP/V1bR ont été détectés aux jours embryonnaires 13 et 15 dans des cultures de thymus foetal (Hansenne et al, 2005).

1.4. NO/NOS dans la fonction et le développement du coeur

Le monoxyde d'azote ou l'oxyde nitrique (NO), un vasodilatateur connu, est une molécule hautement réactive et rapidement inactivée par des mécanismes non-enzymatiques. C'est une molécule ubiquitaire qui joue un rôle important dans de nombreux processus physiologiques ou physiopathologiques notamment au niveau cardiaque (e.g. les modifications vasculaires de remodelage).

Les **NO synthases** (NOS) (*L-arginine,NADPH:oxygène oxydoréductases*; EC 1.14.13.39) sont des enzymes impliquées dans la synthèse de NO. Les NOS forment une famille d'hémoprotéines semblables au cytochrome-P450. Elles sont capables de catalyser l'oxydation à 5 électrons de la L-arginine en NO et en L-citrulline. Trois isotypes de NOS ont été identifiés: nNOS (NOS neuronale ou NOS1), iNOS (NOS inductible ou NOS2) et eNOS (NOS endothéliale ou NOS3). Les NOS sont codées par 3 gènes distincts: NOS1, NOS2 et NOS3, respectivement présents sur les chromosomes 5, 11, 5 chez les souris, 12, 10, 4 chez les rats, et 12, 17, 7 chez les humains. Les isotypes de NOS sont distribués dans différents tissus et cellules et une même cellule peut exprimer plus d'un isotype. Les eNOS et nNOS sont constitutives dans les cellules où elles sont exprimées, la iNOS est une forme inductible qui apparaît sous certaines conditions.

La **nNOS**, une protéine de 168 kDa découverte initialement dans les neurones, est exprimée dans le système nerveux, les cellules épithéliales, le muscle squelettique, le trophoblaste, le muscle cardiaque, le rein, le testicule, la glande surrénale, le poulmon, le foie, le pénis, l'urètre, la prostate et la rétine (Chao et al, 1998). Elle est

indétectable dans le cœur de l'embryon de souris (Bloch et al, 1999). La nNOS est importante dans la différenciation neuronale et agirait par une voie indépendante du GMPc (Phung et al, 1999). L'inactivation du gène NOS1 chez la souris homozygote (-/-) normal donne une tendance à l'hypotension lors de l'anesthésie (Mashimo et Goyal, 1999). L'absence de NOS1 cause des anomalies graves du vidangeage gastrique (Mashimo et al, 2000). La nNOS se trouve notamment dans les jonctions synaptiques mais aussi associée à la dystrophine près de la membrane de la cellule musculaire. En l'absence de dystrophine, la nNOS se localise anormalement dans le cytoplasme des muscles de la souris *mdx* (le modèle animal de la myopathie de Duchenne, une dégénérescence musculaire sévère due à l'absence de dystrophine) et produit continuellement du NO, ce qui pourrait contribuer à la pathologie chez les patients atteints de la dystrophie de Duchenne.

La **iNOS** est induite par des endotoxines, des interleukines (IL6), le facteur de nécrose tumoral-alpha (TNF α), des interférons (IFN γ) (Lowenstein et al, 1993). C'est une protéine de 130 kDa exprimée dans les macrophages, les cellules endothéliales, les cellules endocardiaques, le muscle lisse vasculaire, les fibroblastes, le rein, le foie, la rétine, les cellules de moëlle osseuse (Shido et al, 1995; Balligand et al, 1993). Elle est détectable dans le cœur de souris entre les jours embryonnaires 9,5 et 14,5 (Bloch et al, 1999) puis diminue jusqu'à des niveaux faibles. La iNOS est présente aussi dans des tumeurs et maladies du muscle cardiaque (Arnhold et al, 2002) et est importante pour la différenciation neuronale (Phung et al, 1999). Après induction de iNOS, la production de NO est largement supérieure à celle induite par les NOS constitutives (eNOS et nNOS), ce qui explique des modes d'action différents du NO selon l'origine de sa synthèse (Méry et al, 1996).

La **eNOS**, caractérisée initialement dans les cellules endothéliales vasculaires, est une protéine de 135 kDa. Elle est exprimée dans les cardiomyocytes auriculaires et ventriculaires, les cellules endocardiaques, les myocytes squelettiques adultes, les neurones, le placenta, le foie et le rein (Balligand et Cannon, 1997). Elle est détectable dans le cœur entre les jours embryonnaires 9,5 et 14,5 puis diminue jusqu'à des niveaux faibles (Bloch et al, 1999). Elle inhibe la prolifération de cellules

de muscle lisse vasculaire, l'agrégation des plaquettes et l'adhésion de monocytes (Radomski et al, 1987). Elle inhibe aussi le tonus contractile du cœur et favorise une relaxation diastolique (Massion et Balligand, 2003).

Les souris homozygotes déficientes pour eNOS ont une pression artérielle chroniquement plus élevée de 20 mm Hg que leur homologues normales NOS3^(+/+) (Bers, 2002). L'activité de eNOS intervient dans la régulation à long terme de la pression artérielle, maintenant une vasodilatation basale. Les eNOS et nNOS sont stimulées par l'augmentation du calcium intracellulaire, la formation subséquente de complexes calcium-calmoduline et l'activation de récepteurs couplés à la PLC. Le NO est produit par les myocytes cardiaques ainsi que par les cellules endothéliales avoisinantes, et les trois isotypes de NOS coexistent dans les myocytes cardiaques (Massion et Balligand, 2003; Damy et al, 2004). NO se fixe sur le groupement hémique de la guanylate cyclase soluble (sGC) stimulant ainsi la production intracellulaire de GMPc qui active une protéine - kinase dépendante du GMPc. Cette kinase active les canaux potassiques et donc l'hyperpolarisation et la relaxation du muscle lisse vasculaire. Le NO est également capable de stimuler des canaux potassiques dépendants du calcium.

L'oxydoréduction de la L-arginine en NO et L-citrulline par les NOS (Fig. 1.9) se fait en 2 étapes avec la génération d'un composé intermédiaire très instable, la N,G-hydroxy-L-arginine. Ces 2 étapes sont stéréospécifiques et sont inhibées par certains analogues structuraux de la L-arginine dont le plus connu est le L-NAME (N,G-nitro-L-arginine méthyl ester). L'administration chronique pendant 4 semaines de L-NAME à des rats Wistar-Kyoto induit une hypertension dépendants du temps et de la dose, associée à une diminution du GMPc pariétal aortique. L'administration systémique d'analogues de l'arginine provoque une vasoconstriction prolongée et dépendante de la dose augmentant la pression artérielle (Gauthier et al, 1998).

Chez le rat spontanément hypertendu (SHR), L-NAME provoque une augmentation de l'hypertension, une hypertrophie ventriculaire et de la mortalité, mais chez le rat Wistar normotendu, L-NAME induit une hypertension non accompagnée d'une hypertrophie ventriculaire gauche (Llorens et al, 2005; Vandecasteele et al, 1998; Blondel et al, 1997). D'autre part, il a été montré que L-NAME inhibe l'action

inotropique et chronotropique négative de OT sur le cœur (Mukaddam-Daher et al, 2001). Une déficience de eNOS cause un arrêt cardiaque et, pendant le développement cardiaque, des défauts congénitaux du septum associés avec une augmentation de l'apoptose des cardiomyocytes (Feng et al, 2002).

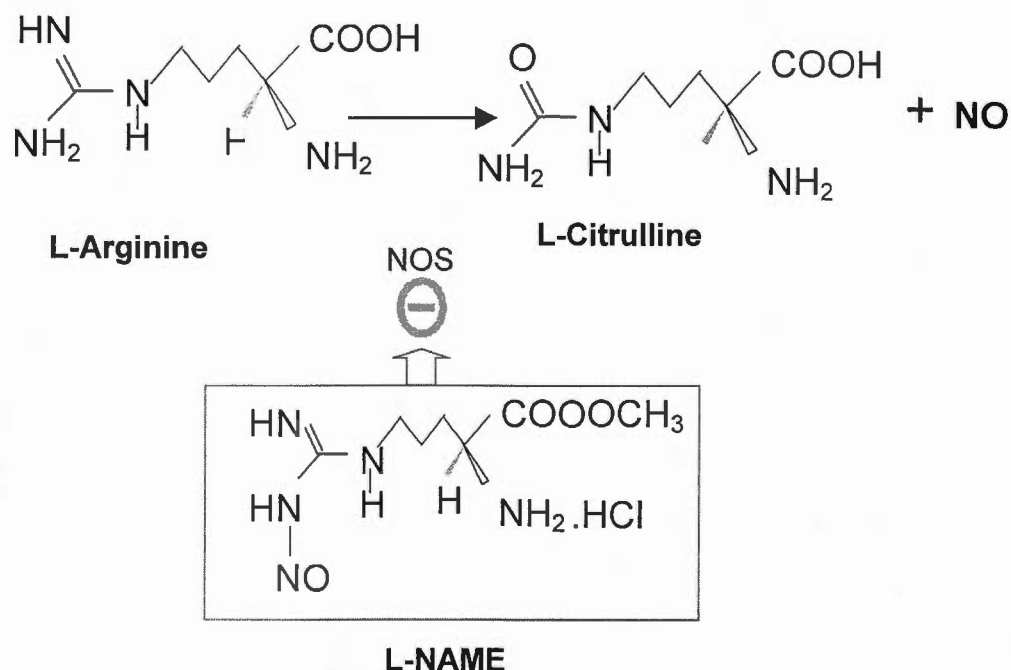


Fig. 1.9. Réaction de production enzymatique de NO. La réaction nécessite la participation des co-facteurs tétrahydrobioptérine (BH₄), flavine adénine dinucléotide (FAD) et flavine mononucléotide (FMN). Le L-NAME, un analogue de la L-arginine, inhibe l'activité NOS (*Adapté de Ignarro, 1990*).

En plus, l'oxyde nitrique est aussi associé avec OT/OTR. Ainsi, OT induit une augmentation de NO chez les cellules endothéliales humaines (Thibonnier et al, 1999).

1.5 Le modèle de différenciation cellulaire P19

Les cellules cardiaques adultes déjà différenciées et les cardiomyocytes foetaux et néonataux déjà déterminés ne permettent pas d'étudier les mécanismes se rapportant à la différenciation cardiaque. Les cellules souches (*stem cells*) embryonnaires sont le meilleur outil. La lignée cellulaire de carcinome embryonnaire de souris P19 est un des modèles de cellules souches embryonnaires permettant d'étudier la différenciation cardiaque *in vitro*. Les cellules P19 sont issues de la masse interne du blastocyste (5ème jour de développement) représentant une structure de 16-40 cellules. Ces cellules sont *pluripotentes* car elles peuvent produire tous les feuillets embryonnaires (mésoderme, endoderme, ectoderme) et les tissus qui en dérivent. Implanté dans l'utérus, le blastocyste entier peut se développer en un fœtus viable. Implantées dans un site extrautérin, les cellules du blastocyste forment une masse tumorale appelée tératocarcinome. Cette masse contient divers types cellulaires dont des cellules souches pluripotentes appelées cellules de carcinome embryonnaire (EC). Ces dernières peuvent être isolées et cultivées *in vitro*. Les cellules P19 sont des cellules EC dérivées d'un tératocarcinome formé par la transplantation d'un embryon de souris âgé de 7,5 jours dans un testicule de souris adulte (McBurney, 1993). Le moment de la transplantation a précédé la différenciation cellulaire et la séparation des couches germinales. Les cellules P19 sont donc des cellules non-différenciées ayant un comportement de cellules embryonnaires avec une croissance rapide et une capacité de se diviser à l'infini (McBurney, 1993). Comme les cellules embryonnaires normales, les cellules P19 sont développementalement pluripotentes (Fig. 1.10). Les cultures de cellules P19 comme les cultures primaires de cellules souches embryonnaires permettent d'étudier les mécanismes de différenciation cellulaire. Les cellules P19 sont plus faciles à cultiver que les cellules primaires, ne nécessitant pas une co-culture avec des cellules nourricières ou des inhibiteurs de différenciation. Les cellules P19 peuvent être différenciées en cellules de type musculaire notamment en présence de diméthylsulfoxyde (DMSO) (Rudnicki et McBurney, 1987). Elles peuvent se différencier en cellules de type neuronal en présence

d'acide rétinoïque (RA 10^{-6} M) (Rudnicki et McBurney, 1987; Edwards et McBurney, 1983). Des études électrophysiologiques par patch-clamp ont montré que les cellules cardiaques dérivées des cellules P19 forment des sous-populations de cardiomyocytes ressemblant aux cellules cardiaques embryonnaires (Wobus et al, 1993) et présentent divers phénotypes cardiaques: cellules de Purkinje, cellules pace-maker, et cardiomyocytes auriculaires et ventriculaires.

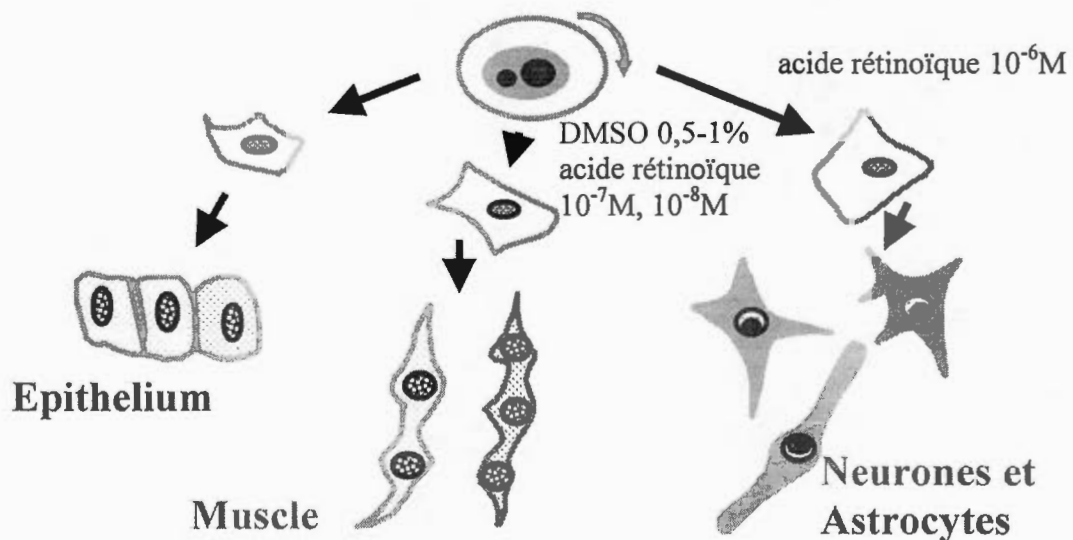


Fig. 1.10. Le modèle cellulaire P19. Les cellules de carcinome embryonnaire de souris P19 ressemblent aux cellules souches embryonnaires: elles sont indifférenciées, prolifératives et pluripotentes. Elles se différencient en dérivés cellulaires des trois couches germinatives in vivo et in vitro. In vitro, l'acide rétinoïque (RA) utilisé à une concentration de 10^{-6} M induit la différenciation en cellules du neuroectoderme. Des concentrations plus faibles d'acide rétinoïque (10^{-7} , 10^{-8} M) ou le diméthylsulfoxyde (0,5-1%) induisent la différenciation en cellules musculaires de type cardiaque et squelettique qui sont des cellules du mésoderme (*Adapté de McBurney*).

Elles expriment des canaux ioniques dont le récepteur de dihydropyridines (DHPR) (van der Heyden MA et al, 2003), et des protéines structurales spécifiques dont la chaîne lourde de la myosine sarcomérique (MHC) (Habara-Ohkubo, 1996).

Transplantées, elles expriment des protéines d'adhésion et de gap junctions (connexine-43, desmoplakine, N-cadhérine) (Wentlandt et al, 2004, 2005).

On connaît encore peu d'agents cardiomyogéniques capables d'induire la différenciation de cellules souches en cardiomyocytes. Dans le modèle P19, c'est avec le DMSO que les mécanismes de différenciation cardiaque ont été le plus étudiés malgré que cet inducteur ne soit pas physiologique. Le DMSO induit l'expression de facteurs de transcription importants pour le développement cardiaque (ex. GATA-4, Nkx-2.5, MEF2C), établissant l'adéquation du modèle P19 pour étudier la différenciation en cardiomyocytes. Les mécanismes d'induction par le DMSO ne sont pas compris (Grépin et al, 1997; Skerjanc et al, 1998). On a cependant rapporté que le DMSO cause une hausse temporaire de 5 min du calcium intracellulaire (Morley et Whitfield, 1993). Les cardiomyocytes générés par le DMSO battent de façon rythmique et expriment l'ARNm de l'ANF (Boer, 1994). L'hormone thyroïdienne T3 (30 nM; Rodriguez et al, 1994), la vitamine C (10^{-4} M; Takahashi et al, 2003) et, dans une étude toute récente, le NO artificiellement généré par la substance SNAP (N-acétyl-3-(nitrosothio)-D-valine, 200 μ M; Kanno et al, 2004), peuvent aussi induire une différenciation cardiaque dans les cellules P19 ou dans les cellules souches embryonnaires normales, mais les mécanismes sont inconnus.

En relation avec T3, il faut noter que le gène Nkx 2-5 est très tôt exprimé dans l'embryon dans la zone d'induction cardiaque pendant la gastrulation, puis autour de l'aire thyroïdienne où les premiers précurseurs cardiaques sont détectés. D'autre part, le gène GATA-4 trouvé dans le cœur et dans d'autres organes cibles de T3 est important dans le contrôle de l'expression de marqueurs cardiaques comme la MHC et l'ANP (Wobus et al, 1997).

Etonnamment, la dynorphine, une hormone peptidique, peut induire la différenciation cardiaque de cellules P19 (Ventura et Maioli, 2000). Elle agirait sur un récepteur opioïde nucléaire via la PKC. En absence de DMSO, la dynorphine B stimule l'expression des gènes GATA-4 et NKx-2.5 dans les cellules P19, puis celle des gènes de la chaîne lourde- α (α MHC) et de la chaîne légère-2v (MLC-2v) de la myosine, deux protéines marqueurs cardiaques (Ventura et al, 2003). Les cellules

différenciation en cellules battantes (Ventura et al, 2003), indiquant que la PKC est impliquée dans le mécanisme d'action de la dynorphine.

Comme outil supplémentaire pour analyser la différenciation cardiaque, nous avons utilisé une lignée clonale de cellules P19 recombinantes, les P19Cl6-GFP développées par Dr. Mummery. Ces cellules ont été transfectées avec le gène de la protéine de fluorescence verte (GFP) placé sous le contrôle d'une séquence de 250 pb du promoteur de la MLC-2v cardiaque. Ces cellules fluorescent lorsqu'elles se différencient en cardiomyocytes ventriculaires (Moore et al, 2004).

1.6. Présentation de quelques marqueurs cellulaires généraux et phénotypiques

Dans le présent travail, nous avons utilisé quelques marqueurs pour analyser le phénotype de cellules souches indifférenciées et différenciées en cardiomyocytes. Voici des informations sur ces marqueurs.

a) SSEA-1

Des antigènes de surface de cellules souches non différenciées ou des cellules embryonnaires précoces peuvent servir de marqueurs de l'état non-différencié. L'antigène SSEA-1 (*Stage Specific Embryonic Antigen-1*, Solter and Knowels, 1978) a été répertorié chez la souris et identifié comme étant le trisaccharide fucosyl-N-acétyl-lactosamine présent sur des glycoprotéines et glycolipides (Tetteroo et al, 1986; Marani et al, 1986). Les cellules souches P19 qui sont utilisées dans cette thèse (voir section 1.5) expriment l'antigène SSEA-1 dans l'état non-différencié et perdent cet antigène lorsqu'elles sont différenciées.

b) GATA - 4

Une famille de facteurs de transcription qui joue des rôles critiques pendant la cardiogénèse est la famille des facteurs de transcription GATA. Cette famille est composée de six membres (GATA-1 à GATA-6). Retrouvés chez tous les vertébrés,

ils sont essentiels au développement d'une panoplie d'organes et de tissus. GATA-1, -2 et -3 sont exprimés dans les cellules souches hématopoïétiques où ils régulent l'expression de gènes spécifiques aux lymphocytes T, aux cellules érythroïdes et aux mégacaryocytes. GATA-4, -5 et -6 sont exprimés dans une variété de tissus dérivés du mésoderme et de l'endoderme comme le cœur, le foie, les poumons, les gonades et l'intestin où ils jouent des rôles de régulation d'expression de gènes spécifiques de ces tissus. En particulier, le facteur GATA-4 est essentiel pour le développement cardiaque et l'hypertrophie adaptative des cardiomyocytes. GATA-4 seul ou complexé à d'autres facteurs de transcription cardiaque (e.g. NKx2.5, MEF2) régule l'expression d'autres gènes cardiaques comme le gène de la chaîne lourde de la myosine (MHC) (Molkentin et al, 1994; Takahashi et al, 2003).

c) Chaîne lourde- α de la myosine cardiaque (MHC)

Le muscle cardiaque est constitué de différents types de fibres qui interviennent dans la contraction musculaire. La myosine, qui représente environ 50% des protéines myofibrillaires, joue un rôle important dans les mécanismes de la contraction. La myosine intracytoplasmique est composée de 2 chaînes lourdes (200 kDa) et de 4 chaînes légères (de 15 à 30 kDa). Aux extrémités NH_2 des chaînes lourdes sont associées deux chaînes légères de 190 acides aminés, constituant la tête de la protéine (Fig. 1.11). C'est au niveau des chaînes lourdes que se trouve l'activité ATPasique qui fournit l'énergie nécessaire à la contraction.

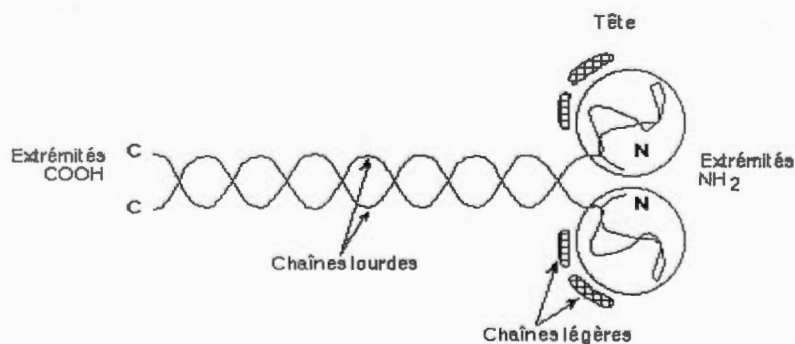


Fig. 1.11. Représentation schématique de la structure de la molécule de myosine (Adapté de Lowey et al, 1969).

d) Le récepteur des dihydropyridines (DHPR)

La contraction du muscle cardiaque est la conséquence d'un accroissement transitoire de la concentration de Ca^{2+} libre intracellulaire ($[\text{Ca}]_i$) au cours du potentiel d'action cardiaque. L'ouverture de canaux calciques de la membrane plasmique est à l'origine de cet accroissement de $[\text{Ca}]_i$. L'augmentation de $[\text{Ca}]_i$, amplifiée par la libération de Ca^{2+} par le réticulum sarcoplasmique, déclenche le processus mécanique qui résulte de l'activité des protéines contractiles. Le processus de couplage excitation-contraction du muscle (Fig. 1.12) implique un complexe qui assure un lien entre les deux membranes plasmiques des muscles cardiaques. Ce complexe comprend le récepteur des dihydropyridines (DHPR) qui détecte le potentiel membranaire et le canal calcique du réticulum, ou récepteur de la ryanodine (RyR), qui se font face dans la membrane du réticulum endoplasmique. Des protéines annexes sont associées et participent à la régulation de l'ensemble (Dulhunty et al 2002). Le DHPR est localisé dans les tubules transverses (tubules T) et les cavéoles, deux structures sarcolemmales qui contiennent aussi NOS. Les cavéoles, décrites pour la première fois dans les années 1950 par G.E. Palade et E. Yamada, sont des invaginations en forme d'oméga (50-100 nm) de la membrane plasmique. Un des constituants essentiels de cet organite est la cavéoline (21-22 kDa), formant des oligomères et capable de lier le cholestérol. Plusieurs types de cavéolines ont été identifiés, associés à la membrane plasmique ou à des compartiments golgiens. Les cavéolines 1 et 2 sont ubiquitaires, généralement co-exprimées et capables de former des hétéro-oligomères. La cavéoline-3, abondante dans les cellules endothéliales et les adipocytes, a une expression restreinte dans le tissu musculaire où elle est impliquée dans la formation des tubules T (Drab et al. 2001).

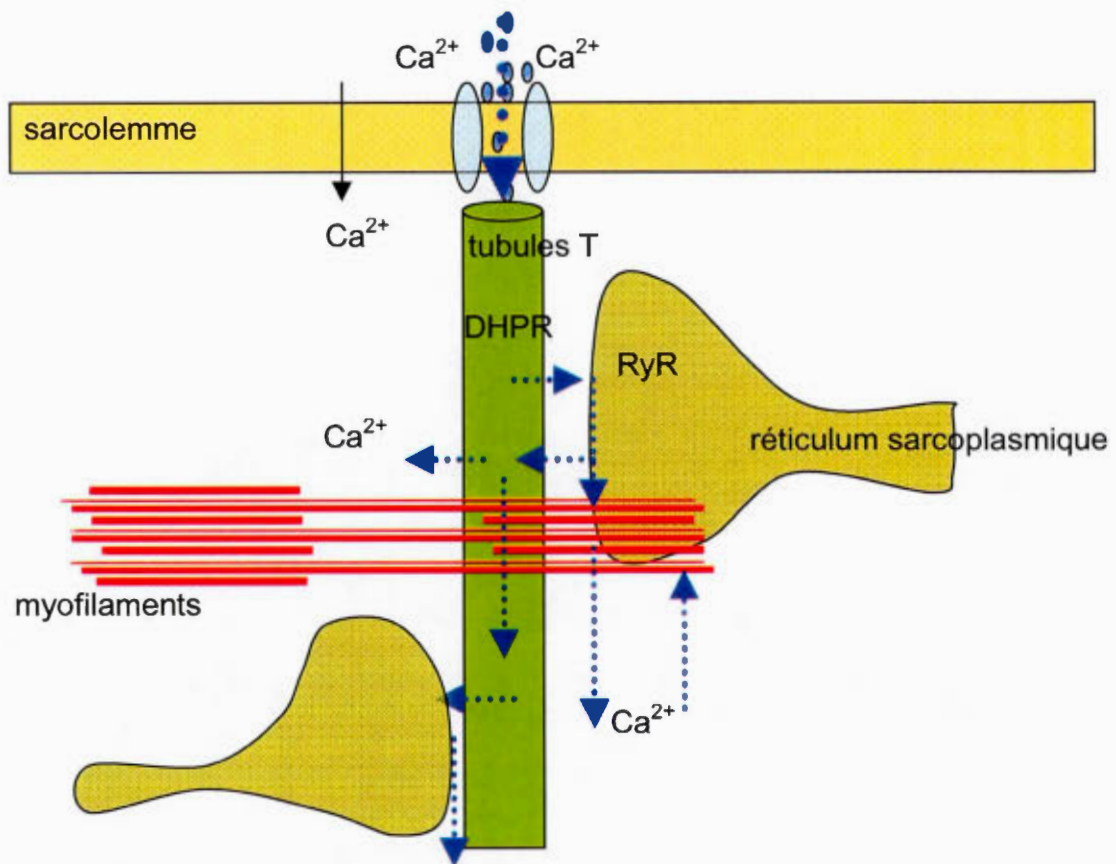


Fig. 1.12. Processus du couplage excitation-contraction musculaire (*Adapté de Mejia-Alvarez et al, 2003*).

Des études ont rapporté de plus, la co-localisation de OTR avec la cavéoline-1 dans l'utérus qui causerait ainsi une élévation de la concentration de calcium intracellulaire (non associé aux cavéoles) et une élévation de l'AMPc conduisant à une prolifération cellulaire (Cassoni et al, 2004). La cavéoline-1 peut agir comme un inhibiteur de eNOS. Il a été proposé qu'un des rôles des cavéoles est d'inhiber, par séquestration dans l'organite, plusieurs molécules impliquées dans la signalisation. Le NO cible le RyR et module son activation lors d'une dépolarisation. Les eNOS et nNOS contribuent à faciliter le couplage normal d'excitation-contraction (Pelat et al, 2005, Massion et al, 2005).

e) Le peptide natriurétique auriculaire (ANP)

ANP est le premier membre de la famille des peptides natriurétiques (NP) cardiaques à avoir été découvert (de Bold et al. 1981). Deux autres membres ont été ensuite découverts: BNP (*B-type, brain natriuretic peptide*) et CNP (*C-type natriuretic peptide*). Les trois NP sont codés par des gènes différents. L'ANP stimule la natriurèse (l'excrétion de sodium dans l'urine) et la diurèse (la production d'urine) par augmentation du taux de filtration glomérulaire et inhibition de la réabsorption tubulaire du sodium dans les reins. L'ANP abaisse la pression sanguine en relaxant les muscles lisses artériels et en réduisant le débit cardiaque par diminution du retour veineux. Les activités physiologiques de ces trois peptides dépendent de deux récepteurs membranaires de type R1 possédant une activité guanylyl cyclase: le récepteur GC-A et le récepteur GC-B, ainsi que d'un troisième récepteur qui est un récepteur de clairance (C) de type R2. L'ANP se retrouve principalement dans le cœur, au niveau des oreillettes. À l'origine, l'ANP a été isolé à partir de l'oreillette du cœur d'un sujet adulte où les nucléotides de l'ARN messenger pour l'ANP d'une longueur de 1,000 représentent 1-3 % d'ARN total trouvé (Genest et Cantin, 1988). Un travail ultérieur a montré que ANP n'est pas une hormone exclusive de l'oreillette, une forte concentration d'ANP ayant été trouvée dans la veine cave (Asai et al, 1987; Larsen et al, 1988; Sola et al, 1990) et dans la veine pulmonaire (Springall et al, 1988; Toshimori et al, 1988). L'ANP et son ARNm ont été localisés dans l'adventice de l'arc aortique supposé contenir des barorécepteurs et en petite concentration dans l'aorte thoracique (Gardner et al, 1987). L'ANP a été détecté dans divers tissus, incluant la glande surrénale et différentes régions du cerveau (Gutkowska et Nemer, 1989; Perreault et Gutkowska, 1995; Gosselin et al, 1997). Dans les cœurs de nouveaux-nés l'ANP est présent dans les oreillettes, et atteint des niveaux élevés dans les ventricules en corrélation avec une induction de la prolifération des cellules cardiaques et une hypertrophie cellulaire (Wu et al, 1988). Peu de temps après la naissance, simultanément avec un arrêt de prolifération des cardiomyocytes, l'expression d'ANP diminue rapidement dans les ventricules et l'ANP est présent seulement dans les oreillettes (Cameron et Ellmers, 2003).

f) Rhodamine - marqueur général

La Rhodamine 123 (2-[6-Amino-3-imino-3H-xanthene-9-yl] acide benzoïque méthyl ester) est un colorant vital, cationique et lipophile. Il est utilisé en microscopie à fluorescence comme marqueur de mitochondries dans les cellules. Le potentiel membranaire de la mitochondrie étant de 2 à 3 fois plus élevé que celui de la membrane plasmique favorise l'accumulation de la sonde dans la mitochondrie. La cellule cardiaque possède de nombreuses mitochondries à cause de ses besoins élevés en énergie pour assurer les contractions musculaires.

1.7. Hypothèse et objectifs spécifiques

Les événements initiaux de la formation du cœur, plus particulièrement ceux de la cardiomyogénèse, sont encore imparfaitement compris. Comme OT et OTR sont élevés dans le cœur de nouveaux-nés et aussi détectés dans des structures développementales précoces (oocytes, cumulus), nous avons émis l'hypothèse que OT pourrait avoir un rôle dans la différenciation cardiaque de cellules souches embryonnaires. Pour évaluer cette hypothèse, nous avons utilisé le modèle cellulaire P19 en poursuivant les objectifs spécifiques suivants :

- déterminer si le traitement de cellules P19 avec OT peut induire la différenciation en cardiomyocytes selon un mécanisme dépendant du OTR ;
- déterminer si l'action cardiomyogénique du DMSO et de RA implique OTR ;
- déterminer si l'action cardiomyogénique de OT implique NO ;
- déterminer si les intermédiaires biosynthétiques de OT (OTX : OT-Gly-Lys-Arg, OT-Gly-Lys, OT-Gly) sont cardiomyogéniques.

Voici les grandes lignes des stratégies expérimentales utilisées. Le protocole de différenciation cardiaque des cellules P19 avec divers agents a été réalisé de la façon suivante : les cellules P19 sont cultivées en agrégats suspendus pendant 4 jours dans du milieu de culture contenant des inducteurs et/ou des inhibiteurs. Au jour 4, les agrégats sont transférés dans des microplaques où ils adhèrent au

support de culture, et ils sont cultivés en absence des divers agents. Nous avons comparé différents inducteurs (DMSO, OT, OTX, RA et SNAP, un générateur de NO), en absence ou en présence d'un antagoniste de OT et d'inhibiteurs des NOS et de la guanylyl cyclase soluble (sGC). Des cultures témoins ont aussi été faites sans inducteur, antagoniste et inhibiteur. À partir du jour 4, nous avons suivi l'apparition de cellules battantes dans les cultures. Nous avons aussi analysé l'expression de divers marqueurs par immunocytochimie, immunobuvardage et réaction en chaîne de la polymérase (PCR). Les cellules P19Cl6-GFP ont été utilisées dans certaines expériences pour suivre la différenciation par microscopie de fluorescence et par cytométrie en flux.

Chapitre II

LE SYSTEME OT/OTR INDUIT LA DIFFERENCIATION DE CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES P19 EN CARDIOMYOCYTES

2.1. Explication de la contribution

Ce chapitre contient l'article qui a été publié dans la revue *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)* 2002 par Joanne Paquin et Bogdan A. Danalache, comme co-premiers auteurs, et par Marek Jankowski, Samuel M. McCann et Jolanta Gutkowska (*Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Jul 9;99(14):9550-5). Bogdan A. Danalache a fait les expériences et a aussi mis au point le protocole de différenciation cardiaque avec OT, une méthode de quantification des cellules battantes et les analyses immunologiques et moléculaires. Il a contribué aussi à la rédaction de l'article. Les travaux ont mené au dépôt d'une demande de brevet (annexe). Les résultats ont été publiés dans *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002, 99, p.9550-5.

2.2. Résumé

Nous avons découvert récemment l'existence du système ocytocine/récepteur de l'ocytocine (OT/OTR) dans le coeur. L'activation d'OTR cardiaque stimule la libération du peptide natriurétique auriculaire (ANP) qui est impliqué dans la régulation de la pression sanguine et de la croissance cellulaire. Ayant observé des niveaux élevés de OT dans le coeur foetal et nouveau-né à une étape d'hyperplasie intense des cardiomyocytes, nous avons supposé un rôle pour OT dans la différenciation en cardiomyocytes. Nous avons utilisé les cellules souches

embryonnaires P19 de souris pour établir ce rôle potentiel. Les cellules P19 génèrent la formation de dérivés cellulaires de toutes les couches germinales. Le traitement d'agrégats cellulaires P19 avec le diméthylsulfoxyde (DMSO) induit la différenciation en cardiomyocytes. Dans ce travail, les cellules P19 ont été cultivées en agrégats du jour 0 au jour 4 en présence de 0.5% DMSO, de 10^{-7} M OT et/ou de 10^{-7} M d'un antagoniste d'OT (OTA), puis cultivées en absence de ces facteurs jusqu'au jour 14. OT seul a stimulé la production de colonies cellulaires battantes dans les 24 puits de culture au jour 8 du protocole de la différenciation alors que le même résultat a été obtenu dans les cellules induites par DMSO seulement après 12 jours. Les cellules induites avec OT ont exhibé une augmentation de l'ARNm d'ANP, avaient des mitochondries abondantes puisqu'ils ont absorbé fortement la rhodamine123, et ont exprimé la chaîne lourde de la myosine sarcomérique et le récepteur de la dihydropyridine- α 1, confirmant un phénotype de cardiomyocyte. De plus, OT aussi bien que DMSO ont augmenté la protéine OTR et l'ARNm d'OTR, et OTA a complètement inhibé la formation de cardiomyocytes dans les cultures induites par OT et DMSO. Ces résultats suggèrent que le système OT/OTR joue un rôle important dans la cardiogénèse en promouvant la différenciation en cardiomyocytes.

Oxytocin Induces Differentiation of P19 Embryonic Stem Cells to Cardiomyocytes

Joanne Paquin^{1†*}, Bogdan A. Danalache^{1,2†}, Marek Jankowski², Samuel M.
McCann³ and Jolanta Gutkowska²

¹Laboratoire de neuroendocrinologie développementale, Département de chimie et
de biochimie, Université du Québec à Montréal, Montréal (Québec),
Canada H3C 3P8;

²Laboratoire de biochimie cardiovasculaire, Centre hospitalier de l'Université de
Montréal (CHUM), Hôtel-Dieu, Montréal (Québec), Canada H2W 1T7;

³Pennington Biomedical Research Center, Louisiana State University, Baton
Rouge, LA 70808-4124, USA

[†]Equal first authors.

*To whom reprint requests should be addressed:

Joanne PAQUIN, Ph.D.

Laboratoire de neuroendocrinologie développementale,

Département de chimie et de biochimie,

Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succursale Centre-ville,

Montréal (Québec) H3C 3P8 Canada; Tel: (514) 987-3000, ext. 4990;

Fax: (514) 987-4054; E-mail: paquin.joanne@uqam.ca

Published in Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Jul 9;99(14):9550-5

Abbreviations:

ANP, atrial natriuretic peptide; BSA, bovine serum albumin; DHPR, dihydropyridine receptor; DMSO, dimethylsulfoxide; MHC, myosin heavy chain; OT, oxytocin; OTA, oxytocin antagonist; OTR, oxytocin receptor; PBS, phosphate-buffered saline; RA, retinoic acid; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; TBS, Tris-buffered saline

Running title: Oxytocin induces cardiomyocyte differentiation

Keywords: Oxytocin, oxytocin receptor, oxytocin antagonist, heart development, cardiomyocyte differentiation, cardiac malformations and diseases, immunochemistry, PCR, dimethylsulfoxide

2.3. Abstract

We recently discovered the existence of the oxytocin/oxytocin receptor (OT/OTR) system in the heart. Activation of cardiac OTR stimulates the release of atrial natriuretic peptide (ANP), which is involved in blood pressure and cell growth regulation. Having observed elevated OT levels in the fetal and newborn heart at a stage of intense cardiomyocyte hyperplasia, we hypothesized a role for OT in cardiomyocyte differentiation. We used mouse P19 embryonic stem cells to substantiate this potential role. P19 cells give rise to the formation of cell derivatives of all germ layers. Treatment of P19 cell aggregates with dimethylsulfoxide (DMSO) induces differentiation to cardiomyocytes. In this work, P19 cells were allowed to aggregate from day 0 to day 4 in the presence of 0.5% DMSO, 10^{-7} M OT and/or 10^{-7} M OT antagonist (OTA), and then cultured in the absence of these factors until day 14. OT alone stimulated the production of beating cell colonies in all 24 independently growing cultures by day 8 of the differentiation protocol whereas the same result was obtained in cells induced by DMSO only after 12 days. Cells induced with OT exhibited increased ANP mRNA, had abundant mitochondria since they strongly absorbed rhodamine¹²³, and expressed sarcomeric myosin heavy chain and dihydropyridine receptor- α 1, confirming a cardiomyocyte phenotype. In addition, OT as well as DMSO increased OTR protein and OTR mRNA, and OTA completely inhibited the formation of cardiomyocytes in OT- and DMSO-supplemented cultures. These results suggest that the OT/OTR system plays an important role in cardiogenesis by promoting cardiomyocyte differentiation.

2.4. Introduction

Oxytocin (OT), a nonapeptide largely expressed in the hypothalamus, has long been recognized as a female reproductive hormone necessary for uterine contraction during parturition, timing and amplification of labour, milk ejection during lactation, and ovulation (1). However, the last decades have shed new light on OT functions. It has been shown that both sexes have equivalent concentrations of OT in the hypophysis and plasma as well as a similar number of oxytocinergic neurons in the hypothalamus (2), and respond to the same stimuli for OT release (3, 4). It also appears that reproductive functions and maternal behaviour are preserved in OT^{-/-} mutant mice (5). Both OT^{-/-} males and females are fertile, and females are capable of parturition although they lack the milk ejection reflex (5, 6). These observations indicate that OT is not essential for reproduction, and data now underline the involvement of OT in sexual behaviour, cognition, memory, tolerance, adaptation, food and water intake, and cardiovascular functions (1, 7, 8).

Recently, a new role has been suggested for OT as a growth and cellular differentiation factor. The antiproliferative effect of OT, mediated by OT receptors (OTR), has been documented in breast cancer cells (9) and other tumors (10-12). In contrast to its effect on tumoral cells, a mitogenic action of OT has also been described. OT stimulates the proliferation of thymocytes (13, 14) and mitotic activity in the prostate epithelium (15), vascular endothelium (16) and trophoblasts (17). OT has also been reported to enhance myoepithelial cell differentiation and proliferation in the mouse mammary gland (18). The possibility that OT has trophic effects on the embryo has not been investigated intensively. However, OT has been shown to have an influence on the developing heart: OT administered in excess to the fetus may impair cardiac growth in humans and rats (19, 20), and OTR suppression by specific OT antagonists (OTA) in the early stage of chicken egg development leads to cardiac malformation in the embryos (21). It is not known whether the trophic effects of OT on the heart are direct or indirect.

OT's indirect actions could be related to its cardiovascular functions observed in adult rats (7, 22-24). Indeed, we uncovered the entire OT/OTR system in the rat heart, and showed that cardiac OTR activation is coupled to the release of atrial

natriuretic peptide (ANP), a potent diuretic, natriuretic and vasorelaxant hormone that is also involved in cell growth regulation (7, 8). A role for ANP in cardiomyogenesis has even been suggested by Cameron et al. (25). In support of a potential action of OT on cardiac development, a maximal OT protein level was seen in the heart at day 21 of gestation and postnatal days 1-4, when cardiac myocytes are at a stage of intense hyperplasia (26).

The P19 mouse embryonal carcinoma cell line is an established model of cell differentiation. Developmentally, pluripotent P19 cells give rise to the formation of cell derivatives of all 3 germ layers (27, 28) and appear to differentiate via the same mechanisms as normal embryonic stem cells (27, 29). When cultured in the presence of 10^{-6} M retinoic acid (RA), a physiologically-relevant morphogen, P19 cells efficiently ($\geq 95\%$) differentiate to neurons (27, 30, 31). The solvent DMSO induces cardiac differentiation, albeit not as efficiently ($\leq 15\%$) (27, 32). DMSO has been shown to activate essential cardiogenic transcription factors, such as GATA-4 and Nkx-2.5 (32, 33). However, the mechanisms responsible for triggering these genes in the embryo are still unknown, as is the mode of action of DMSO with respect to the cardiomyogenic program in P19 cells.

Our discovery of a functional OT/OTR system in the heart, in conjunction with the fact that it is expressed at higher levels in developing than in adult hearts, led us to consider OT as a potential naturally-occurring cardiomorphogen. In this respect, we investigated whether OT induces differentiation of P19 cells into a cardiomyocyte phenotype.

2.5. Materials and Methods

Culture and differentiation of P19 cells. P19 cells were propagated and differentiated according to the procedures of Rudnicki and McBurney (28), with minor modifications. Undifferentiated cells were propagated in complete medium containing α -modified Eagle's minimal essential medium (GIBCO-BRL Burlington, Ontario, Canada) supplemented with 2.5% heat-inactivated fetal bovine serum, 7.5% heat-inactivated donor bovine serum (Cansera International, Rexdale, Ontario, Canada), and the antibiotics (GIBCO-BRL) penicillin G (50 U/ml) and streptomycin (50 μ g/ml). The cultures were maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and passaged every 2 days. The general protocol used for differentiation of P19 cells is depicted in Figure 2.1.

Differentiation was routinely induced with DMSO. Briefly, 0.25×10^6 cells were allowed to aggregate for 4 days in non-adhesive bacteriological grade petri dishes (6-cm diameter) containing 5 ml complete medium, in the presence of 0.5% (v/v) DMSO (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). At day 2 of aggregation, the inducing culture medium was replenished. At day 4, aggregates were transferred to tissue culture grade vessels (10-cm diameter dishes or 24/48-well plates), and cultured in complete medium in the absence of differentiation-inducing agent. Aggregation was also done in the absence of DMSO, and in the presence of 10^{-7} M OT and/or 10^{-7} OTA [$d(\text{CH}_2)_5^1, \text{Tyr}(\text{Me})^2, \text{Thr}^4, \text{Orn}^6, \text{Tyr-NH}_2^9$]-vasotocin), both from Peninsula Laboratories Inc. (San Carlos, CA). In some cases, the aggregation period lasted 6 days; this difference is indicated whenever used. The cell populations were analyzed on days 10-14 of the entire differentiation protocol, at a time when cardiac cells normally beat synchronously.

Cell morphology, staining and immunocytochemistry. Examinations were done under a Zeiss inverted microscope (Zeiss IM, Carl Zeiss, Jena, Germany) equipped with phase-contrast objectives, filters for rhodamine and fluorescein fluorescence, a MC 100 camera and a photoautomat unit. Micrographs were taken with Kodak

Technical Pan film (for cell morphology) or with Kodak T-Max 400 or Elite-II 100 film (for fluorescence).

For morphological examination, cells were grown directly onto the plastic surface of tissue culture vessels. For staining with rhodamine¹²³ (Sigma), day-4 aggregates were distributed in 24-well culture plates and grown until day 8. Then, dye was added to the culture medium at a final concentration of 1 µg/ml for 45 min, and afterwards, the cells were washed extensively with phosphate-buffered saline (PBS) and cultured for 48 h in the absence of the dye. Dye retained by cells in each well was measured by a fluorescence microplate reader (SPECTRA Max Gemini, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) at 505 nm for excitation and 534 nm for emission.

For immunocytofluorescence studies, cells were grown onto glass coverslips coated with 0.1% gelatin. They were then fixed by 20-min incubation in PBS containing 4% paraformaldehyde, rinsed in PBS and stored at 4°C in this buffer until used. All subsequent steps of permeabilization, washing and incubation with antibodies were performed at room temperature. Fixed cells were permeabilized for 10 min in PBS containing 0.005% saponin, blocked for 60 min in PBS-BSA-saponin (PBS containing 1% bovine serum albumin and 0.005% saponin), incubated for 45 min with the primary antibody diluted 1/50 and for 45 min with a fluorescein-conjugated swine anti-goat IgG antibody (Biosource International, Camarillo, CA) diluted 1/1000. PBS-BSA-saponin was used for washing between incubations and antibodies were diluted in the same buffer but containing 1.5% normal swine serum (Jackson Immuno Research Laboratories Inc., West Grove, PA). Coverslips were mounted in PBS containing 50% glycerol, and immediately examined under the microscope. The primary antibodies were all from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA) and produced in goat: antibody C-20 against OT receptor (OTR), antibody K-16 against sarcomeric myosin heavy chain (MHC), and antibody N-19 against dihydropyridine receptor- α 1 (DHPR- α 1).

Analysis by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Total cellular RNA was extracted with TRIzol Reagent (Invitrogen Life Technologies,

Burlington, Ontario, Canada), and poly(A)⁺mRNA was affinity purified from 200 µg of total RNA onto Oligotex mRNA columns (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada), as per the manufacturers' instructions. First-strand cDNA was synthesized in a final volume of 40 µl containing first-strand buffer, 3 µg of cellular RNA, 4 µl of hexanucleotide primers (Amersham-Pharmacia, Baie d'Urfé, Quebec, Canada), and avian myeloblastosis virus reverse transcriptase (12 units/µg RNA; Invitrogen). First-strand cDNA (5 µl) was then used for PCR amplification with OTR, ANP or GAPDH exon-specific oligonucleotide primers in a Robocycler Gradient 40 thermocycler (Stratagene, La Jolla, CA). Sequences of mouse OTR and ANP genes have been described (26, 34). Conditions for RT-PCR analysis of mouse OTR were adapted from Wagner et al. (6, 7). For all PCR studies the number of cycles used was within the linear range of amplification. The OTR sense and antisense primers were respectively the 22-bp 5'-AAGATGACCTTCATCATTGTTC-3' and the 23-bp 5'-CGACTCAGGACGAAGGTGGAGGA-3'. Amplification was performed over 32 cycles, each involving 1 min at 94°C, 1.5 min at 62°C and 1.5 min at 72°C, and was terminated by a 5-min final extension at 72°C. The ANP antisense and sense primers were respectively the 24-bp 5'-GTCAATCCTACCCCGAAGCAGCT-3' and the 20-bp 5'-CAGCATGGGCTCCTTCTCCA-3'. Amplification was performed over 25-30 cycles, each involving 1 min at 94°C, 1 min at 65°C and 3 min at 72°C, and was terminated by a 5-min final extension at 72°C. The amplification of GAPDH mRNA, a constitutively and ubiquitously expressed gene, served as an internal standard for RT-PCR analysis. The 23-bp antisense primer 5'-CAGTGATGGCATCCACTGTGGTC-3' and the 23-bp sense primer 5'-AAGGTCGGTGTCAACCCATTGGCCGT-3' were used. Amplification was performed over 23 cycles, each involving 1 min at 94°C, 1.5 min at 59°C and 2 min at 72°C.

Western blot analysis. Cells were collected by scraping, homogenized in sucrose buffer (20 mM Hepes/Tris, pH 7.4, containing 250 mM sucrose and 20 µg/ml of the protease inhibitor phenylmethylsulfonyl fluoride), then centrifuged at 3,000 g for 10 min at 4°C to remove debris. The supernatants were centrifuged at 100,000 g for 45

min at 4°C, and the pellets were resuspended in sucrose buffer for analysis of protein content by a modified Bradford assay (30). Aliquots (20 µg protein) were subjected to polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE) under reducing conditions (35) followed by electrotransfer onto pure nitrocellulose membrane (Hybond-C; Amersham-Pharmacia). Molecular size calibration was achieved using Broad Standard Solution (Bio-Rad Laboratories Ltd., Mississauga, Ontario, Canada). The nitrocellulose blots were blocked overnight with 5% nonfat milk in Tris-buffered saline (TBS: 20 mM Tris·Cl, pH 8.0, 140 mM NaCl, 1% BSA and 0.1% Tween-20), then probed with goat C20 antibody (anti-OTR; 1/1,000) for 2 h at room temperature. Antibody incubations and washes were performed in TBS throughout. Detection was realized by enhanced chemiluminescence with an Amersham-Pharmacia ECL kit and an appropriate peroxidase-conjugated secondary antibody (29). Autoluminograms were developed in an AFP Imaging Mini-med 190 X-Ray Film Processor (AFP Corp., Elmsford, NY).

2.6. Results

Using the time schedule depicted in Figure 2.1, treatment of P19 cell aggregates with 10^{-7} M OT induced the formation of rhythmically-beating cells resembling primary cardiomyocytes isolated from the heart of newborn animals. A similar phenotypic change was already reported for treatment with 0.5-1% DMSO (27, 28, 30, 32). We observed that aggregates treated with OT or DMSO had a 1.5-fold smaller mean diameter than their untreated counterparts (data not shown), a finding that could reflect the antimitotic activity of OT and DMSO.

We examined whether treatment of cell aggregates with OT induced the expression of the cardiac muscle markers sarcomeric MHC and DHPR- α 1. Sarcomeric MHC is expressed in contractile muscular cells as is DHPR- α 1, a component of intracellular junctions critical for the coupling of excitation-contraction (27, 32, 36). As presented in Figure 2.2B, undifferentiated cells were negative for MHC, as reported (27, 28, 32), and for DHPR- α 1. However as with DMSO, OT induced the appearance of numerous, intense, immunoreactive foci in cell populations (Figs 2.2A, B). In both cases, there were cell subpopulations that did not respond positively (Fig. 2.2A) and seemed to be mainly undifferentiated cells according to morphological criteria. We and others have shown that undifferentiated cells remain in DMSO-treated P19 cultures by probing for Stage-specific Embryonic Antigen-1, an established marker of the undifferentiated state (27, 28, 30). Cell aggregates not exposed to OT or DMSO were not positive for MHC and DHPR- α 1 although they sometimes showed very rare and small immunoreactive foci (Fig.2.2B, No inducer). This occasional staining could be due to spontaneous differentiation events triggered by high cell densities such as those encountered in aggregates (27, 28).

We also compared the cardiogenic potency of OT and DMSO. First, potency was simply quantitated by rhodamine¹²³ retention in cells, taking advantage of the fact that this dye, which penetrates all cell types, is retained for much longer periods (days instead of hours) in cardiac cells than in other cell types (37). To meet their energy requirements for muscular contraction, cardiomyocytes have indeed

abundant mitochondria, the cell organelles that accumulate rhodamine¹²³. Figure 2.3A shows that exposure of the cell aggregates to OT and DMSO increased cellular retention of the dye by 2.5-3 fold compared to non-induced aggregates, and this increase at day 10 of differentiation was even higher after OT than DMSO treatment. Since P19-derived cardiomyocytes beat in culture, we also compared the time course of appearance of beating cells after treatment of aggregates with DMSO or OT. We found that OT stimulated the production of beating cell colonies in all 24 independently growing cultures by day 8 whereas the same result was obtained in cells induced by DMSO only by day 12 (Fig. 2.3B). The cardiogenic action of OT was specific and receptor-mediated, since no cardiomyocyte-like beating cells, were seen when 10^{-7} M OTA was used in place of OT or in combination with OT (Fig. 2.3B). Interestingly, OTA also abolished the cardiogenic action of DMSO (Fig. 2.3B).

Finally, cardiogenic potency was evaluated via ANP expression since this peptide is abundantly produced by cardiomyocytes. The results showed that at day 14 of differentiation ANP mRNA level was upregulated in OT-treated P19 aggregates as compared to undifferentiated cells, and this upregulation was at similar level after DMSO treatment (Fig. 2.3C). As for cell beating, OTA prevented OT- and DMSO-induced upregulation of ANP expression (Fig. 2.3C). Altogether, rhodamine¹²³ absorption, and the time-course of formation of beating cells and abundance of ANP mRNA pointed to a potent cardiomyogenic effect of OT. In addition, the cardiomyogenic action of OT and even that of DMSO appear to be mediated by OTR that are activated by endogenous or exogenous OT.

To further investigate the involvement of OTR in cardiomyogenesis, we examined OTR expression in P19 cells. OTR protein (Fig. 2.4A, B) and mRNA (Fig. 2.4C) were present at low levels in undifferentiated cells, indicating that these cells can respond minimally to OT. OTR expression remained at low levels in aggregates not exposed to OT or DMSO (Fig. 2.4C, No inducer). In contrast, intense OTR immunoreactive foci are observed in cell populations after OT or DMSO treatment (Fig. 2.4A). These findings corresponded to the results of Western blotting (Fig. 2.4B) and RT-PCR analysis of OTR (Fig. 2.4C), both indicating increased OTR expression. In accordance with the absence of a cardiomyogenic effect of OTA and

the inhibitory action of OTA on OT-induced cardiac differentiation, OTA did not upregulate OTR expression by itself and inhibited OT-induced OTR upregulation (Fig. 2.4B). Thus, the OTR-dependent cardiogenic effect of OT and DMSO seems to involve upregulation of OTR expression.

2.7. Discussion

This report shows that OT added to the culture medium of P19 stem cell aggregates induced cardiomyogenic differentiation, which was demonstrated by monitoring the expression of MHC, DHPR- α 1 and ANP cardiac markers, retention of a mitochondrial-specific dye and the appearance of beating cell colonies. The cardiogenic effect of OT was specific and mediated by OTR because it was abolished by OTA. OT also upregulated OTR expression. These results suggest a new role for the OT/OTR system in heart genesis and development.

The P19 cell line is an excellent cell differentiation model that mimics the events of early cardioembryogenesis. Differentiation of P19 cells to cardiomyocytes by aggregation and exposure to DMSO was shown to be associated with induction of the cardiac-specific subtype of endothelin receptors (38). In addition, brain natriuretic peptide and ANP were observed in newly-formed striated muscle structures upon DMSO treatment and not in undifferentiated P19 cells and their neuronal derivatives (39). In this work, DMSO- and OT-induced ANP transcript levels reached about 5-10% of that found in the adult mouse atrium - the richest site of ANP synthesis. Several transcription factors having an essential role in cardiogenesis are upregulated in DMSO-induced P19 cells. This was shown to be the case for the zinc-finger containing GATA-4, the homeobox gene Nkx2-5, and the myocyte enhancer factor 2C (32, 33, 40), and the overexpression of either factor in P19 cells was sufficient to induce cardiac differentiation in the absence of DMSO (32, 41, 42). Little is known about the molecular mechanisms underlying the activation of these genes, but DMSO was found to increase intracellular Ca^{2+} levels and was suspected to affect a pathway that has an extracellular component, possibly serum-borne (27, 43, 44). Interestingly, our data indicate that OTR are upregulated to a similar extent by OT and DMSO, and other studies have reported that OTR function modulates intracellular Ca^{2+} concentration in some cell types (1). OT produced by P19 cells or their derivatives is the logical source of the endogenous OT responsible for differentiation into cardiomyocyte since OT synthesis was demonstrated in cardiomyocyte cultures from newborn rats (7). This conclusion is further supported

by the ability of OTA to inhibit differentiation. Furthermore, OT levels were significantly higher in the cardiac chambers of fetuses and 1-day-old neonates than in adult animals (26). Hartman et al. (45) also reported OT levels that are high in the plasma of young animals and decrease during development.

One of the mechanisms by which OT and DMSO trigger cardiac differentiation involves OTR since both agents upregulated the expression of this receptor, and OTA totally abolished their cardiomyogenic action as well as prevented OT-stimulating effect on OTR expression. Homologous regulation of OTR expression by OT itself was observed in the brain and in astroglial cell cultures (46, 47). It is noteworthy that, like DMSO, RA, used at low levels (10^{-8} - 10^{-9} M), induces cardiac differentiation of P19 cells (27, 28). This observation could have some relevance to the OT/OTR system since RA was shown to upregulate OT expression in the fetal heart (26). Further investigations are required to clarify the relationships that could exist between OT/OTR, DMSO and RA in the P19 cell model.

Several studies have proposed a role for OT as a growth and differentiation/maturation factor in a gestational/perinatal context. In the mother, OT is required for postpartum alveolar proliferation, and induces differentiation and proliferation of myoepithelial cells of the mammary gland necessary for milk ejection (1, 18). The OT/OTR system is expressed in human cumulus/luteal cells surrounding oocytes and weak OTR gene expression is even observed in oocytes (48). Moreover, when fertilized mouse oocytes are cultured with OT in vitro, they develop at a higher rate into the blastocyst stage than their unstimulated counterparts (48). Spontaneous myometrial contractures are known to occur during pregnancy in sheep and controlled contractures induced by application of OT pulses to pregnant ewes have been shown to accelerate fetal cardiovascular function (49).

All these studies thus strongly suggest involvement of the maternal and embryonal OT/OTR systems in development of the embryo, and our work points to a particular involvement of OT in the priming of cardiogenesis. We think that OT could also assist the maturation of newly-differentiated cardiomyocytes by stimulating their fusion since beating cells derived from OT-induced P19 cells formed fiber-like structures. Such a fusogenic action was recently reported for OT on skeletal

myoblasts in vitro (50). Our results may find application in regenerative therapies that consider the replacement of cardiac tissue lost after injury. In this context, OT could be used as a trophic factor to assist the compensatory division of myocytes shown to occur in infarcted organs (51), or to prime the cardiomyogenesis of a variety of progenitor/stem cells to be grafted in the injured heart (52, 53).

In conclusion, our study indicates that OT primes the cardiac differentiation of embryonic stem cells, and its action is mediated by OTR and a transduction pathway(s) which has yet to be defined. These results suggest that the OT/OTR system plays an important role in heart development.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by a grant of the Canadian Institutes of Health Research (MT-11674 to J.G, MT-15049 to M.J. and J.G.), a grant from Université du Québec à Montréal (to J.P.), and National Institutes of Health Grant MH-51853 (to SMM)

2.8. References

1. Gimpl, G. & Fahrenholz, F. (2001) *Physiol Rev.* **81**, 629-683.
2. Ashton, N. & Balment, R. J. (1991) *Acta Endocrinol. (Copenh)* **124**, 91-97.
3. Stoneham, M. D., Everitt, B. J., Hansen, S., Lightman, S. L. & Todd, K. (1985) *J Endocrinol* **107**, 97-106.
4. Verbalis, J. G., Mangione, M. P. & Stricker, E. M. (1991) *Endocrinology* **128**, 1317-1322.
5. Nishimori, K., Young, L. J., Guo, Q., Wang, Z., Insel, T. R. & Matzuk, M. M. (1996) *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 11699-11704.
6. Wagner, K. U., Young, W. S., III, Liu, X., Ginns, E. I., Li, M., Furth, P. A. & Hennighausen, L. (1997) *Genes Funct.* **1**, 233-244.
7. Gutkowska, J., Jankowski, M., Lambert, C., Mukaddam-Daher, S., Zingg, H. H. & McCann, S. M. (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 11704-11709.
8. Jankowski, M., Hajjar, F., Al Kawas, S., Mukaddam-Daher, S., Hoffman, G., McCann, S. M. & Gutkowska, J. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 14558-14563.
9. Cassoni, P., Sapino, A., Fortunati, N., Munaron, L., Chini, B. & Bussolati, G. (1997) *Int. J. Cancer* **72**, 340-344.
10. Cassoni, P., Sapino, A., Stella, A., Fortunati, N. & Bussolati, G. (1998) *Int. J. Cancer* **77**, 695-700.
11. Cassoni, P., Fulcheri, E., Carcangiu, M. L., Stella, A., Deaglio, S. & Bussolati, G. (2000) *J. Pathol.* **190**, 470-477.
12. Copland, J. A., Ives, K. L., Simmons, D. J. & Soloff, M. S. (1999) *Endocrinology* **140**, 4371-4374.
13. Martens, H., Kecha, O., Charlet-Renard, C., Defresne, M. P. & Geenen, V. (1998) *Neuroendocrinology* **67**, 282-289.
14. Geenen, V., Kecha, O., Brilot, F., Charlet-Renard, C. & Martens, H. (1999) *Neuroimmunomodulation.* **6**, 115-125.
15. Plecas, B., Popovic, A., Jovovic, D. & Hristic, M. (1992) *J. Endocrinol. Invest* **15**, 249-253.

16. Thibonnier, M., Conarty, D. M., Preston, J. A., Plesnicher, C. L., Dweik, R. A. & Erzurum, S. C. (1999) *Endocrinology* **140**, 1301-1309.
17. Cassoni, P., Sapino, A., Munaron, L., Deaglio, S., Chini, B., Graziani, A., Ahmed, A. & Bussolati, G. (2001) *Endocrinology* **142**, 1130-1136.
18. Sapino, A., Macri, L., Tonda, L. & Bussolati, G. (1993) *Endocrinology* **133**, 838-842.
19. Chard, T., Boyd, N. R., Forsling, M. L., McNeilly, A. S. & Landon, J. (1970) *J Endocrinol* **48**, 223-234.
20. Schriefer, J. A., Lewis, P. R. & Miller, J. W. (1982) *Biol Reprod* **27**, 362-368.
21. Widmer, H., Durroux, T., Kempf, H., Mouillac, B., Gasc, J. M. & Barberis, C. (1999) *Abstracts of 1999 World Congress on Neurohypophysial Hormones* 94.
22. Haanwinckel, M. A., Elias, L. K., Favaretto, A. L., Gutkowska, J., McCann, S. M. & Antunes-Rodrigues, J. (1995) *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 7902-7906.
23. Favaretto, A. L., Ballejo, G. O., Albuquerque-Araujo, W. I., Gutkowska, J., Antunes-Rodrigues, J. & McCann, S. M. (1997) *Peptides* **18**, 1377-1381.
24. Mukaddam-Daher, S., Lin, Y. L., Gutkowska, J. & Cardinal, R. (2001) *Hypertension*.
25. Cameron, V. A., Aitken, G. D., Ellmers, L. J., Kennedy, M. A. & Espiner, E. A. (1996) *Endocrinology* **137**, 817-824.
26. Gutkowska, J., Bhat, P., Wang, D., Mukaddam-Daher, S., McCann, S. M. & Jankowski, M. (2002) *19th Scientific meeting of the international society of hypertension, Prague, June 2002 (Abstract)*.
27. McBurney, M. W. (1993) *Int J Dev Biol* **37**, 135-140.
28. Rudnicki, M. A. & McBurney, M. W. (1987) in *Teratocarcinomas and embryonic stem cells: a practical approach.*, ed. Robertson, E. J. (IRL Press, Oxford, UK), pp. 19-49.
29. Laplante, I., Paquin, J. & Beliveau, R. (2001) *Brain Res. Dev. Brain Res.* **129**, 157-168.
30. Jeannotte, R., Paquin, J., Petit-Turcotte, C. & Day, R. (1997) *DNA Cell Biol* **16**, 1175-1187.
31. Cadet, N. & Paquin, J. (2000) *Dev Brain Res* **120**, 211-221.

32. Skerjanc, I. S. (1999) *Trends Cardiovasc. Med.* **9**, 139-143.
33. Srivastava, D. & Olson, E. N. (2000) *Nature* **407**, 221-226.
34. Seidman, C. E., Bloch, K. D., Smith, J. A. & Seidman, J. G. (1984) *Science* **226**, 1206-1209.
35. Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680-685.
36. Flucher, B. E. & Franzini-Armstrong, C. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**, 8101-8106.
37. Summerhayes, I. C., Lampidis, T. J., Bernal, S. D., Nadakavukaren, J. J., Nadakavukaren, K. K., Shepherd, E. L. & Chen, L. B. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **79**, 5292-5296.
38. Monge, J. C., Stewart, D. J. & Cernacek, P. (1995) *J Biol Chem* **270**, 15385-15390.
39. Boer, P. H. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **199**, 954-961.
40. Mohun, T. & Sparrow, D. (1997) *Curr. Opin. Genet. Dev.* **7**, 628-633.
41. Grepin, C., Nemer, G. & Nemer, M. (1997) *Development* **124**, 2387-2395.
42. Skerjanc, I. S., Petropoulos, H., Ridgeway, A. G. & Wilton, S. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 34904-34910.
43. Morley, P. & Whitfield, J. F. (1993) *J. Cell Physiol* **156**, 219-225.
44. Wilton, S. & Skerjanc, I. (1999) *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim* **35**, 175-177.
45. Hartman, R. D., Rosella-Dampman, L. M., Emmert, S. E. & Summy-Long, J. Y. (1986) *Endocrinology* **119**, 1-11.
46. Insel, T. R., Winslow, J. T. & Witt, D. M. (1992) *Endocrinology* **130**, 2602-2608.
47. Di Scala-Guenot, D. & Strosser, M. T. (1995) *Am. J. Physiol* **268**, C413-C418.
48. Furuya, K., Mizumoto, Y., Makimura, N., Mitsui, C., Murakami, M., Tokuoka, S., Ishikawa, N., Nagata, I., Kimura, T. & Ivell, R. (1995) *Adv. Exp. Med. Biol.* **395**, 523-528.
49. Shinozuka, N., Yen, A. & Nathanielsz, P. W. (2000) *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* **278**, H41-H49.

50. Breton, C., Haenggeli, C., Barberis, C., Heitz, F., Bader, C. R., Bernheim, L. & Tribollet, E. (2002) *J. Clin. Endocrinol. Metab* **87**, 1415-1418.
51. Beltrami, A. P., Urbanek, K., Kajstura, J., Yan, S. M., Finato, N., Bussani, R., Nadal-Ginard, B., Silvestri, F., Leri, A., Beltrami, C. A. *et al.* (2001) *N. Engl. J. Med.* **344**, 1750-1757.
52. Condorelli, G., Borello, U., De Angelis, L., Latronico, M., Sirabella, D., Coletta, M., Galli, R., Balconi, G., Follenzi, A., Frati, G. *et al.* (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 10733-10738.
53. Jackson, K. A., Majka, S. M., Wang, H., Pocius, J., Hartley, C. J., Majesky, M. W., Entman, M. L., Michael, L. H., Hirschi, K. K. & Goodell, M. A. (2001) *J. Clin. Invest* **107**, 1395-1402.

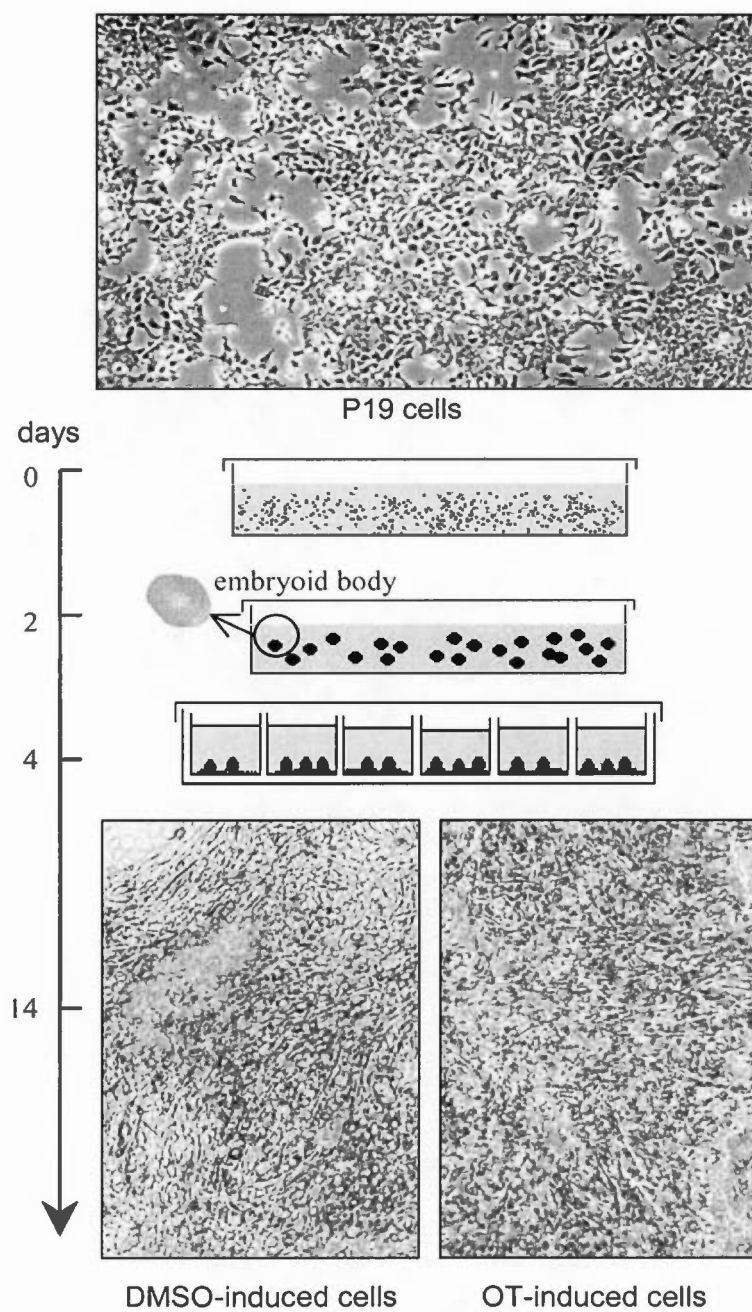


Figure 2.1.

Figure 2.1. Time schedule of the differentiation of P19 cells to cardiomyocytes. P19 cells were cultivated as aggregates from day 0 to day 4 in the presence of DMSO (0.5% w/v) or OT (10^{-7} M) as the agent inducing cellular differentiation. At day 4, aggregates (embryoid bodies) were transferred to tissue culture dishes or multiwell plates and grown in the absence of the agent. Micrographs (100X magnification) show undifferentiated cells and day 14 cardiomyocyte derivatives obtained after DMSO or OT treatment.

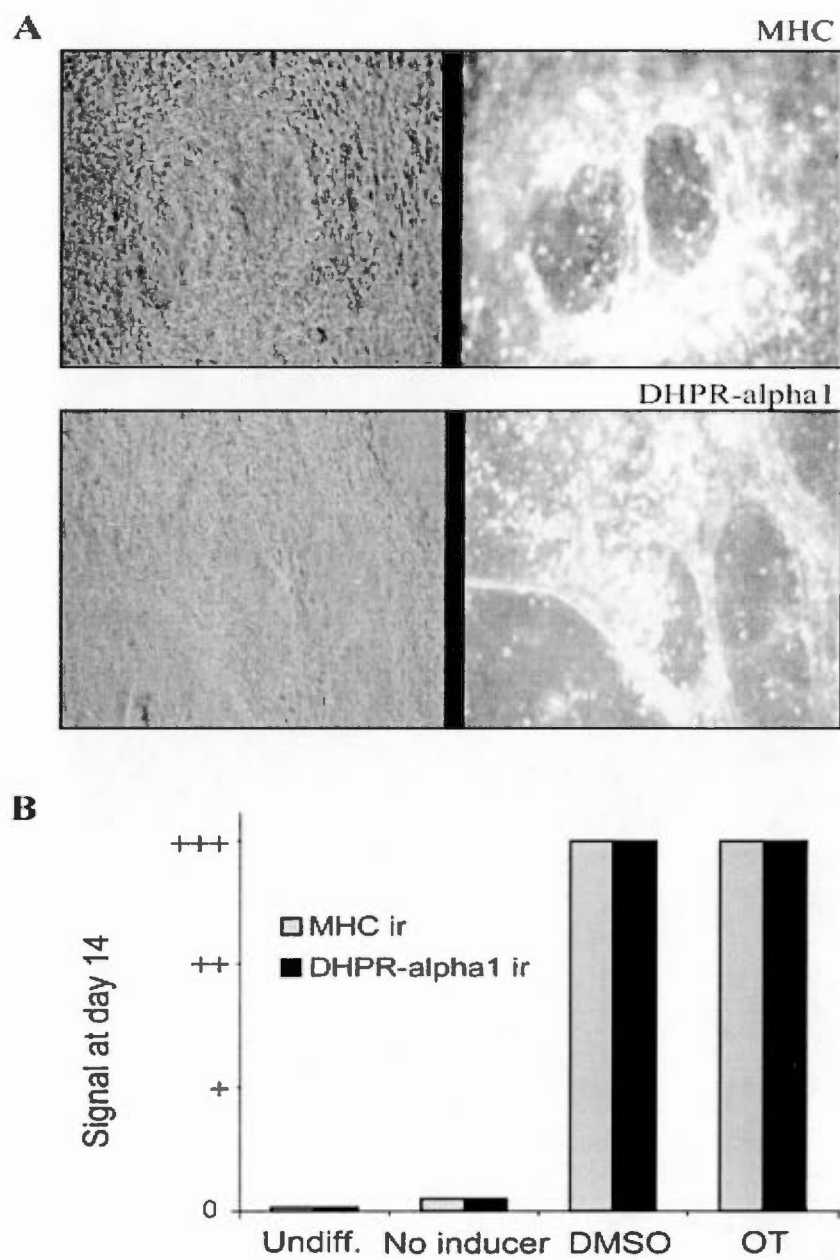


Figure 2.2.

Figure 2.2. OT induces myocyte immunological markers in P19 cells. Day 0 aggregating P19 cells were treated for 4 or 6 days with DMSO, OT or no differentiation agent, and stained on day 14 with anti-MHC or anti-DHPR-alpha1 antibodies. **(A)** Micrographs (100X magnification) show day 14 cells exposed to OT treatment for 4 days. Normal light and fluorescence pictures are presented side by side. **(B)** Immunoreactivity (ir) signals were obtained for undifferentiated cells (Undiff.) grown in monolayers, non-treated cell aggregates (No inducer) and cell aggregates treated with DMSO or OT for the number of days shown between parentheses. Immunoreactive foci were absent (-), very rare (\pm), or abundant (++ and +++). Similar results were obtained from 3 independent experiments.

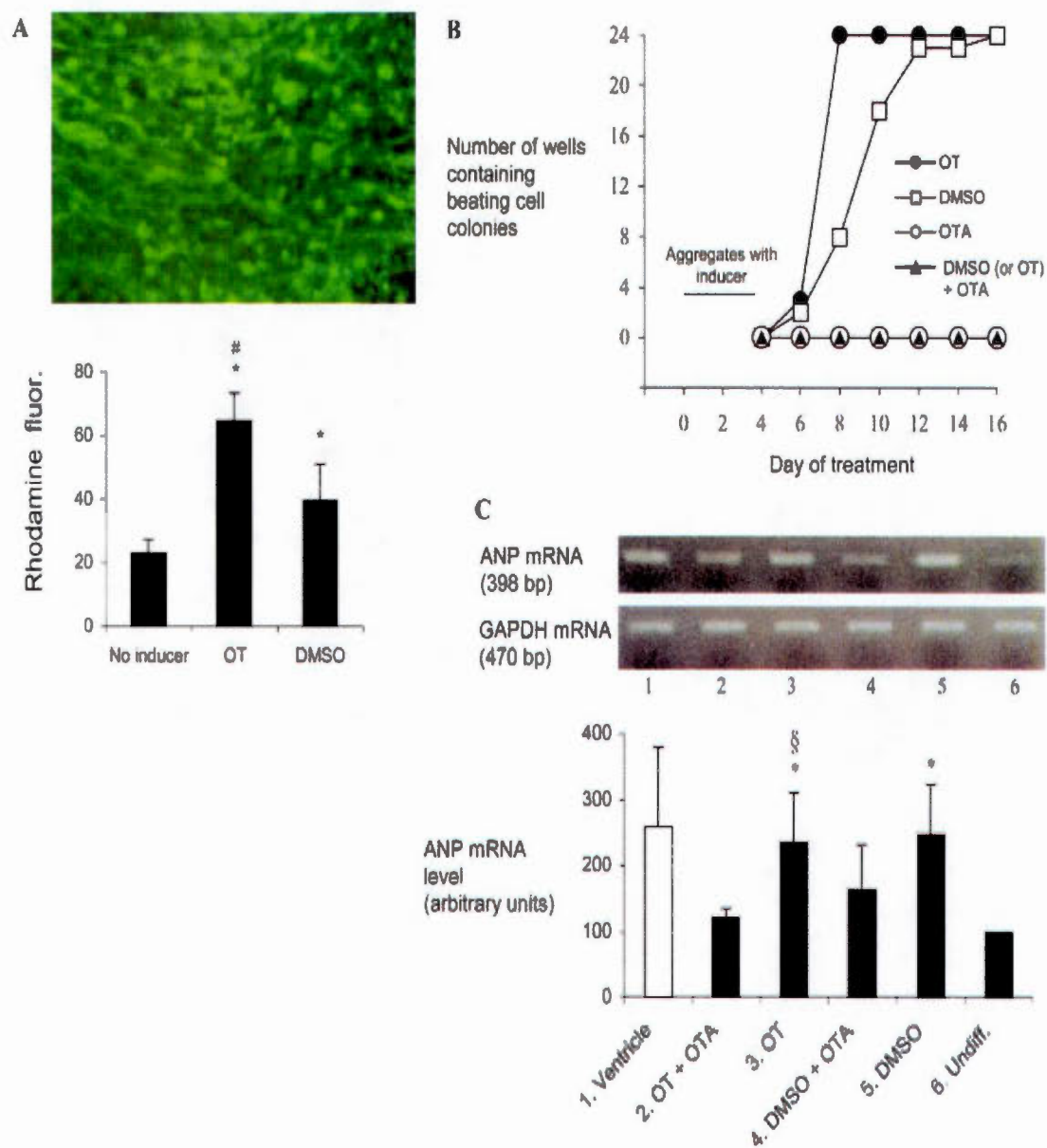


Figure 2.3.

Figure 2.3. Comparison of the cardiomyogenic effect of OT and DMSO. **(A)** Retention of rhodamine¹²³ in non-induced and induced P19 cultures. P19 cells were cultured as aggregates for 4 days in the absence (No inducer) or the presence of OT or DMSO, using 1 petri dish per treatment. At day 4, aggregates of each petri dish were evenly distributed in wells of a 24-well tissue culture plate. At day 8, the cells were incubated for 45 min in the presence of 1 μ g/ml of the dye, washed extensively, and cultured in complete medium without dye for 48 h. The photograph shows rhodamine¹²³ retention by cells induced by OT at day 10 of culture. The retained dye was fluorimetrically quantified for each well, and the results are reported as the means \pm SEM of 24 determinations. **(B)** Time course of appearance of beating cell colonies upon treatment with different agents. Aggregates of 1 petri dish treated for 4 days with the indicated agent(s) were evenly distributed in wells of a 24-well tissue culture plate. Then, each plate was examined at 2-day intervals for the number of wells containing beating cell colonies. The results are representative of 3 independent differentiation experiments ($p < 0.05$). **(C)** RT-PCR analysis of ANP gene transcript in undifferentiated and induced cultures. Cell aggregates were exposed to OT, DMSO and/or OTA from day 0 to day 4, and RNA was extracted at day 14 of the differentiation protocol. ANP transcript was also evaluated in undifferentiated (Undiff.) cells grown in monolayers. Mouse heart ventricle mRNA was used as a positive control. The results are representative of 3 independent differentiation experiments. The GAPDH transcript signal used to verify RT-PCR and gel loading conditions is also shown. Levels of ANP mRNA are expressed relative to corresponding GAPDH mRNA ($p < 0.05$).

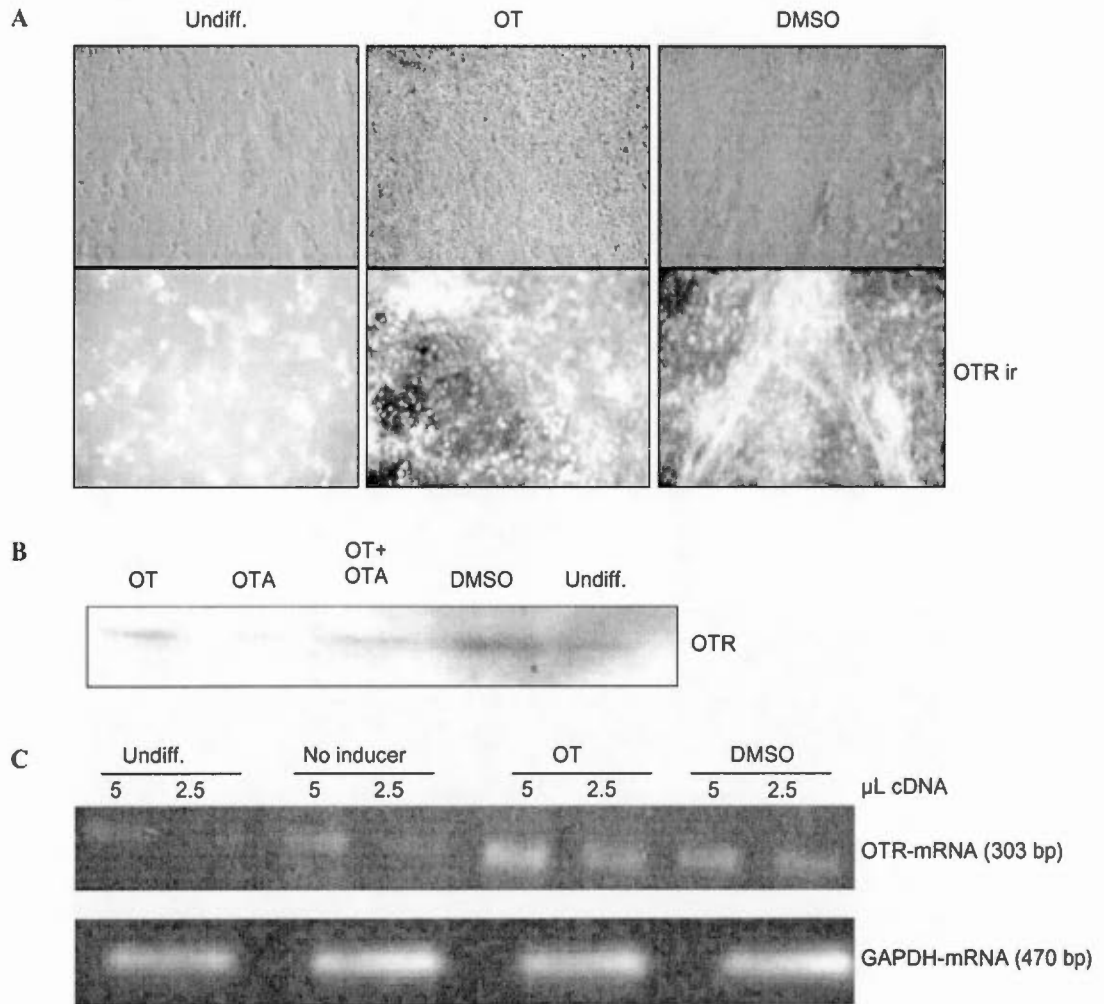


Figure 2.4.

Figure 2.4. OT and DMSO increased OTR expression in P19 cells. P19 cells were cultured as aggregates for 4 days in the absence (No inducer) or presence of DMSO (0.5%), OT (10^{-7} M) and/or OTA (10^{-7} M), and then plated in tissue culture dishes where they grew in the absence of the agent. At day 14 of differentiation, the cells were examined for OTR expression, together with undifferentiated (Undiff.) cells grown in monolayers. The results are representative of 3 independent differentiation experiments ($p < 0.05$). **(A)** Immunocytochemistry. **(B)** Immunoblotting (20 μ g protein/lane). **(C)** RT-PCR.

Chapitre III

L'OCYTOCINE DANS L'ONTOGÉNÈSE CARDIAQUE

3.1. Explication de la contribution

Ce chapitre contient l'article qui a été publié dans la revue *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)* 2004 par Marek Jankowski, Bogdan A. Danalache, Donghao Wang, Pangala Bhat, Fadi Hajjar, Mieczyslaw Marcinkiewicz, Joanne Paquin, Samuel M. McCann et Jolanta Gutkowska. La contribution de Bogdan A. Danalache (Figures 3.6.) a permis de montrer que l'action cardiomyogénique de RA implique le système OT/OTR puisqu'elle est inhibée par OTA. B. A. Danalache a élaboré et réalisé les expériences concernant l'effet de OT et OTA avec RA sur la différenciation cardiaque de cellules P19, incluant les analyses cytologiques et moléculaires correspondantes. Les résultats ont été publiés dans *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:13074-9.

3.2. Résumé

Les études antérieures ont démontré la présence d'ocytocine (OT) et du récepteur de l'ocytocine (OTR) dans le coeur. Le travail présent fournit des résultats qui supportent un rôle potentiel d'OT dans la cardiomyogénèse. Dans cette étude, nous avons montré un niveau maximal de protéines OT et OTR dans le coeur du rat en développement au jour 21 de la gestation et aux jours 1-4 post-nataux, quand les myocytes cardiaques sont à une étape d'hyperplasie intense. Entre les jours post-nataux 1 à 66, OT a diminué linéairement dans tous les compartiments du coeur (4.1-6.6 fois). Également, par immunocytochimie, nous avons démontré que OTR,

fortement présent dans les cardiomyocytes post-nataux, a diminué avec l'âge jusqu'à des niveaux de base chez les adultes. De façon intéressante, dans les vaisseaux coronaires, OTR a augmenté dans les cellules endothéliales aux jours post-nataux 12 et 22, et a atteint un plateau chez les rats adultes. Ces résultats suggèrent qu'OT peut être impliquée dans la formation développementale de vaisseaux coronaires. *In vivo*, le système OT/OTR dans le coeur foetal était sensible à l'action de l'acide rétinoïque (RA), reconnu comme un morphogène cardiaque majeur. Le traitement avec RA a produit une augmentation considérable (2-3 fois) dans la concentration de OT aussi bien que dans les niveaux d'ARNm de OT. *Ex vivo*, un antagoniste de OT a inhibé la différenciation en cardiomyocytes de cellules souches embryonnaires P19 induites par RA. L'expression déclinante de OT cardiaque depuis l'enfance jusqu'à l'âge adulte chez le rat et les changements dans les types cellulaires qui expriment OTR indiquent une régulation dynamique du système OT dans le coeur plutôt qu'une expression constitutive. Les résultats supportent l'hypothèse que RA induit la cardiomyogénèse par activation du système OT cardiaque.

Oxytocin in Cardiac Ontogeny

Marek Jankowski¹, Bogdan A. Danalache^{1,2}, Donghao Wang¹, Pangala Bhat¹, Fadi Hajjar¹, Mieczyslaw Marcinkiewicz¹, Joanne Paquin², Samuel M. McCann³ and Jolanta Gutkowska*¹

¹Centre de recherche, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Pavillon Hôtel-Dieu, 3840 rue Saint-Urbain, Montreal (Que.) H2W 1T8 Canada,

²Laboratoire de neuroendocrinologie développementale, Département de chimie et de biochimie, l'Université du Québec à Montréal, Succursale Centre-ville, Montréal (Québec), H3C 3P8 Canada;

³Pennington Biomedical Research Center, Louisiana State University, 6400 Perkins Road, Baton Rouge, LA 70808-4124, USA

Running title: Oxytocin in cardiogenesis

Keywords: Oxytocin, heart development, oxytocin receptors, retinoic acid, oxytocin antagonist, cardiomyocyte differentiation, immunochemistry, PCR

*To whom reprint requests should be addressed:

Jolanta GUTKOWSKA, Ph.D.

Centre de Recherche - CHUM

Pavillon Hôtel-Dieu, 3840 rue Saint Urbain

Montréal (Que), Canada H2W 1T8

Tel: (514) 890-8000 ext. 2731 / Fax: (514) 412-7204

e-mail: jolanta.gutkowska@umontreal.ca

3.3. Abstract

Previous studies demonstrated the presence of oxytocin (OT) and oxytocin receptors (OTR) in the heart. The present work provides results supporting a potential role of OT in cardiomyogenesis. Here we show that a maximal OT and OTR protein level in the developing rat heart at day 21 of gestation and postnatal days 1-4, when cardiac myocytes are at a stage of intense hyperplasia. Between postnatal days 1 to 66, OT decreased linearly in all heart chambers (4.1-6.6 fold). Correspondingly, immunocytochemistry demonstrated that OTR, which were eminent in postnatal cardiomyocytes, declined with age to low levels in adults. Interestingly, in coronary vasculature, OTRs developed in endothelial cells at postnatal days 12 and 22, and achieved a plateau in adult rats. These findings suggest that OT can be involved in developmental formation of the coronary vessels. In vivo, the OT/OTR system in the fetal heart was sensitive to the actions of retinoic acid (RA), recognized as a major cardiac morphogen. RA treatment produced a significant increase (2-3 folds) both in the OT concentration as well as in the OT mRNA levels. Ex vivo an OT antagonist inhibited RA-mediated cardiomyocyte differentiation of P19 embryonic stem cells. The decline of cardiac OT expression from infancy to adulthood of the rat and changes in cell types expressing OTR indicate a dynamic regulation of the OT system in the heart rather than constitutive expression. The results support the hypothesis that RA induces cardiomyogenesis by activation of the cardiac OT system.

3.4. Introduction

Oxytocin (OT), recognized traditionally as a reproductive hormone with a major role in childbirth and lactation, is produced in high concentrations in the hypothalamic supraoptic nucleus and paraventricular nucleus, then transported from these source nuclei to the posterior pituitary by neurosecretion (1). Longitudinal studies of neural and hormonal circuits activated by experimental volume expansion have identified OT as a major regulator of cardiovascular functions (reviewed in 2, 3). OT, injected peripherally, causes a decrease of arterial pressure (4) while reducing both heart rate (HR) and the force of contractions in isolated atria (5). OT acts *via* neuroendocrine / endocrine / paracrine pathways to release atrial natriuretic peptide (ANP) from the heart (6, 7). ANP is a potent diuretic, natriuretic and vasorelaxant hormone that is also involved in cell growth regulation. In addition, we have demonstrated that in isolated, perfused hearts, an OT antagonist (OTA) blocks basal ANP release (7), suggesting the presence of local OT in the heart. Further study revealed cardiac OT synthesis (8), with OT being detected in the medium of cultured neonatal rat cardiomyocytes (9).

Recently, we showed that P19 embryonic carcinoma cells, a model of mouse embryonic stem cells, express OTR, and OT stimulates the differentiation of these cells into beating cell colonies expressing ANP mRNA and cardiomyocyte-specific markers (10). Other substances reported to induce cardiomyogenesis in the P19 cell model are dimethylsulfoxide (DMSO), RA, T3 and dynorphin (reviewed in 11). The importance of OT was demonstrated when OTA completely inhibited the formation of beating cells, not only in OT- but also in DMSO-induced cultures (10). Another unique feature of OT is that, in addition to differentiation of embryonic P19 cells, this peptide can induce the cardiomyogenic differentiation of adult stem/progenitor cells (12). Recently, it was reported that Sca-1-positive cells (stem cell antigen) isolated from the adult mouse heart, when treated with OT, express genes of cardiac transcription factors and contractile proteins, and display sarcomeric structure and spontaneous beating (12). Ultimately though, it has to be established whether *in vivo*

OT regulates cardiomyocyte differentiation of embryonal or somatic stem cells. However, the data are sparse on any role for OT during development, and in this respect, nothing is known about the OT system in the heart and vasculature. For these reasons, elucidation of the role of the OT/OT receptor (OTR) system and its upstream and downstream signaling pathways needs to be pursued. The OT gene contains response elements for retinoic acid (RA) (13). These elements are functional because the OT uterine gene responds to RA treatments *in vivo* and *ex vivo* in cultured cells (14). OT expression, therefore, might be downstream of RA-induced P19 cardiac differentiation as well. Consequently, in our present studies, we investigated whether or not the OT system is altered in the developing heart, similarly to other genes involved in cardiomyocyte differentiation (reviewed in 15), such as transforming growth factor beta 1 (16), insulin-like growth factor 1 (17) and erythropoietin (18). Furthermore, we examined the hypothesis that the OT system acts in concert with RA during heart development *in vivo*, and *ex vivo* in the P19 cardiomyocyte differentiation model.

3.5. Materials and Methods

Animals. Experiments were performed in accordance with guidelines of the Canadian Council on Animal Care with the approval of the Ethics Committee of the Centre hospitalier de l'Université de Montréal. Pregnant and nonpregnant female and male Sprague-Dawley rats were obtained from Charles River Laboratories (St. Constant, Canada) along with male and nonpregnant female rats at postnatal day (PD) 66. After delivery 1, 4, and 22 day-old pups were sacrificed by decapitation, and their hearts were rapidly excised. To examine the response of the fetal cardiac OT system to RA, pregnant rats at day 21 of gestation were injected (i.p.) with 5 mg of RA, and sacrificed 7 h later to isolate the fetal heart.

Radioimmunoassay (RIA). OT was extracted from heart tissue with heat-activated Vycor glass beads (No. 7930 Mesh 140 Corning Glassworks, Corning, NY). The RIA was developed in our laboratory using specific antibodies generated against OT nonapeptide (8). Synthetic OT (Peninsula Laboratory, Belmont, CA) was labeled with ^{125}I -Na by the lactoperoxidase method. 200 μl of sample or standards (0-200 pg) were incubated with 100 μl of antibody (1:80,000) for 24 h at 4°C. Then, 100 μl of ^{125}I -OT (3,000 cpm) were added to each tube and incubated for 48 h at 4°C. Antibody-bound radioactivity was separated from free radioactivity by adding 1ml dextran-coated charcoal and centrifuged in 4°C at 1,000 x g for 45 min. The radioactivity in the supernatant was then measured in a gamma counter. Standard curves generated with ^{125}I -OT demonstrated a sensitivity of 0.1 pg, linearity in the range of 0.25 to 200 pg/ml, and inter- and intra-assay coefficient of variations of 17.7% and 6.8%, respectively. The cross-reactivity of the antibody was less than 1% with arginine-vasopressin and vasotocin.

Immunocytochemistry (ICC). The tissues of rats at postnatal days 6, 12, 22 and 66 were fixed by heart perfusion with 4% formaldehyde and 0.1% picric acid solution in phosphate buffer 0.1 M, pH 7.4 (19), embedded in wax, and cut into 5- μm sections. For comparison, embryonic, postnatal and adult rat tissues were fixed by immersion

in the same fixative solution and treated in the same way. Prior to ICC, OTR antigenic sites were retrieved by immersing the sections in citrate buffer 0.1 M, pH 6.0, heated to 90°C for 20 min and allowed to cool slowly to room temperature. Goat anti-OTR (No. Sc-8102, Santa Cruz, CA) or rabbit anti-ANP antibodies diluted 1/300 in blocking solution (No. 00-8020, Zymed Laboratories Inc., CA) were revealed by either the biotin-streptavidin method (No. 95-999, Histostain-DS, Zymed Laboratories Inc., CA) or with rabbit anti-goat IgGs-HRP (No. A 5420, Sigma-Aldrich, Canada) as previously reported (19). Controls obtained by the omission of primary antibodies were negative, emphasizing the specificity of ICC.

Autoradiography. Iodinated [d(CH₂)⁵Tyr(OMe)₂,Thr⁴,Tyr⁹-NH₂]OVT (Peninsula Laboratories), a highly specific OTA served as a ligand in binding experiments (7). The binding densities were measured by PhosphorImager software in 4 sections for total binding and four sections in the presence of 10⁻⁶-10⁻¹² M OTA or OT respectively. The binding values in the presence of each cold peptide were averaged and subtracted from total binding for specific binding values.

Culture, Differentiation and Staining of P19 Cells. P19 cells were propagated and differentiated according to the procedures of Rudnicki & McBurney (20), with minor modifications (10). Briefly, 0.25 x 10⁶ cells were allowed to aggregate for 4 days in non-adhesive, bacteriological grade petri dishes (6-cm diameter) containing 5 ml complete medium supplemented with 10⁻⁷ M OT or RA (10⁻⁷ M and 10⁻⁸ M) in the presence or absence of 10⁻⁷ M OTA. On day 4, the aggregates were transferred to tissue culture grade vessels (10-cm diameter dishes or 24-well plates), and cultured in complete medium. The cell populations were analyzed on days 10-14 of the differentiation protocol for beating cell colonies with a Zeiss inverted microscope (Zeiss IM, Carl Zeiss, Jena, Germany) equipped with phase-contrast objectives and a MC 100 camera. For staining with rhodamine123 (Sigma), day-4 aggregates were distributed in 24-well culture plates and grown until day 8. Then, dye was added to the culture medium at a final concentration of 1 µg/ml for 45 min, after which, the cells were washed extensively with phosphate-buffered saline (PBS) and cultured for

48 h without the dye. The dye retained by cells in each well was measured with a fluorescence microplate reader (SPECTRA Max Gemini, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) at 505 nm for excitation and 534 nm for emission.

Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) and Northern blotting. Total cellular RNA was extracted with TRIzol Reagent (Invitrogen Life Technologies, Burlington, Ontario, Canada). First-strand cDNA was synthesized in a final volume of 40 μ l containing first-strand buffer, 3 μ g of cellular RNA, 4 μ l of hexanucleotide primers (Amersham-Pharmacia, Baie d'Urfé, Quebec, Canada), and avian myeloblastosis virus reverse transcriptase (12 units/ μ g RNA; Invitrogen, Life Technologies). The first-strand cDNA (5 μ l) was then utilized for PCR amplification with OT, OTR, or GAPDH exon-specific oligonucleotide primers in a Robocycler Gradient 40 thermocycler (Stratagene, La Jolla, CA). Conditions for RT-PCR analysis of GAPDH, rat OT, and OTR transcripts (7, 8), and mouse OTR (10) have already been described. OTR expression was also investigated in the human heart using cDNA of Human Cardiovascular System MTC Pannel (No. 636749, BD Biosciences Clontech, Mississauga, Canada). OTR forward primer 5'-1470 (bp 1470-1489) and reverse primer 3'-1860 (bp 1860-1841) were designed from the sequence of human OTR, gene bank No. NM-00096. For all PCR studies, the number of cycles employed was within the linear range of amplification.

The retinal dehydrogenase 1 gene expression was analysed by Northern blotting in total RNA from the rat fetal heart and kidneys (E21) as described previously (21).

Western Blot Analysis. Aliquots (20 μ g protein) were subjected to sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) under reducing conditions, followed by electrotransfer onto pure nitrocellulose membrane (Hybond-C; Amersham-Pharmacia). Molecular size calibration was achieved with Broad Standard Solution (Bio-Rad Laboratories Ltd., Mississauga, Ontario, Canada). The nitrocellulose blots were blocked overnight with 5% nonfat milk in Tris-buffered saline (TBS: 20 mM Tris·Cl, pH 8.0, 140 mM NaCl, 1% BSA and 0.1% Tween-20), then probed with goat anti-OTR antibody (1:1,000) for 2 h at room temperature.

Antibody incubations and washes were performed in TBS throughout. Detection was realized by enhanced chemiluminescence with an Amersham-Pharmacia ECL kit and an appropriate peroxidase-conjugated secondary antibody (10, 19).

Statistics. The data are expressed as means \pm standard error of the means (SEM) of a minimum of five different subjects. Statistical comparisons were made using Prism 3 (GraphPad Software, San Diego, CA). Data from the RIA studies were analyzed by one-way ANOVA. Differences were assessed by the Newman-Keuls multiple comparisons test and examined with the linear trend formula. Comparisons between 2 groups were done by unpaired Student's *t* test.

3.6. Results

Identification and regulation of the OT system in the fetal rat heart. Using a specific antibody that selectively recognizes the amidated form of OT, RIA revealed that the heart produces biologically-active OT at least at the end of fetal life (preterm, E21). At this time, total cardiac OT content (105.0 ± 4.9 pg) was 1.6 times lower than that in the whole hypothalamus (168.5 ± 0.5 pg, $n=8$; $P<0.01$). Seven hours after injection with RA to pregnant rats (5mg s.c.) the cardiac OT concentration increased in the fetus (E-21, 0.11 ± 0.02 vs. 0.23 ± 0.03 ng/mg protein, $p<0.01$, Fig. 3.1A) of pregnant rats indicating dynamic OT regulation in the fetal heart. The detection of OT transcript by RT-PCR analysis pointed to the fetal heart as the site of OT synthesis. This synthesis was regulated in the fetal heart at the transcriptional level since OT mRNA expression levels increased 2.6-fold ($p<0.05$, Fig. 3.1B) after RA treatment. RA-stimulated cardiac OT can induce autocrine/paracrine effects because of OT-binding sites present in fetal cardiac sections. This is illustrated by quantitative autoradiography with ^{125}I -OTA bound to fetal heart sections and dose-dependently inhibited by cold OTA (Fig. 3.1C). Analysis of the competition binding curves revealed a single class of high affinity binding sites in the fetal rat heart ($K_d = 1.05$ nM), but the difference of ^{125}I -OTA binding in fetal heart sections from RA-treated and control rats was not significant. Northern blot analysis of total RNA from the fetal heart showed the presence of retinal dehydrogenase type 1 transcripts (Fig. 3.1D), indicating that it has enzymatic machinery to synthesize RA and suggesting that endogenous RA can regulate heart morphogenesis via changes of OT gene expression during development.

Dynamic regulation of the OT system in rats during postnatal development.

OT concentration in the rat heart was studied from PD 1 to PD 66, when the rats were able to reproduce. The results of OT RIA in dissected heart chambers are shown in Figure 3.2A and B. In rats at PD 1, OT concentration was not different in the right ventricle (RV, 1.12 ± 0.12 ng/mg protein), right atrium (RT, 1.28 ± 0.10 ng/mg protein) and left atrium (LA, 1.12 ± 0.10 ng/mg protein), but was significantly higher than in the left ventricle (LV, 0.35 ± 0.02 ng/mg protein, $P<0.001$). Data processing by trend analysis indicated that from PD 1 to PD 66, OT decreased

linearly in the RV (6.6-fold; $R=0.63$; $P<0.0001$), RT (4.1-fold; $R=0.76$; $P<0.0001$), LA (4.6-fold; $R=0.68$; $P<0.0001$) and LV (5.4-fold; $R=0.038$; $P=0.017$). In effect, rats at PD 66 had similar OT concentrations in the RT (0.31 ± 0.02 ng/mg protein) and LA (0.26 ± 0.02 ng/mg protein), lower in the RV (0.18 ± 0.02 ng/mg protein, $P<0.01$ and $P<0.05$ vs. RT and LA, respectively) and lowest in the LV (0.07 ± 0.01 ng/mg protein; $P<0.001$ vs. all other chambers). As shown in Figure 3.1C, OT in the hypothalamus was regulated in the opposite direction as the heart and increased linearly from PD 1 to PD 66 (6.7-fold; $R=0.53$; $P<0.0001$).

As seen in Figure 3.3, OT downregulation is displayed at the transcript level by a significant reduction of OT mRNA from PD 1 to PD 66 in the left atrium. This OT decrease in the heart was associated with OTR mRNA downregulation (Fig. 3.3). A similar regulation was observed in the right atrium and ventricles (data not shown). OTR mRNA downregulation was effectively transmitted to the protein level, as demonstrated by specific antibody binding to OTR by Western blot analysis (Fig. 3.3B).

OTR localization in the maturing rat heart. As a positive standard, OTR immunoreactivity was first detected in the uterus and Fallopian tube (Fig. 3.4A), where smooth muscle cells (Fig. 3.4A'), epithelial cells and stroma macrophages were positively stained (Fig. 3.4A''). A stronger diffused reaction was noted at PD 6, especially in the atria (Fig. 3.4B and B'), but less in ventricular cardiomyocytes. OTR density was similar to ANP regional distribution in the heart, with the highest values in the atria (Fig. 3.4C and C') and much lower values in the ventricles. In adult atria, a relatively weak OTR immunoreaction was found in cardiomyocytes (Fig. 3.4D) compared to intensive OTR labeling of the coronary vasculature (long arrow in Fig. 3.4D). Consistent with previous observations in the rat aorta (19), OTR immunostaining was detected in the endothelium of coronary arteries (Fig. 3.4E). Interestingly, at PD 6, newborn rat endothelial cells appeared unstained, but 30-50% of them were OTR-positive on PD 12 and PD 22.

OTR expression in the human heart. We investigated whether human hearts express OTR mRNA and whether or not the changes of the OT system in cardiac

development are limited to rodents. The RT-PCR analysis of cDNA from the human heart clearly demonstrated elevated OTR transcripts in the fetal heart compared to corresponding samples of adult heart (Fig. 3.5). In the adult human heart, highest OTR expression was in the right auricle and left auricle, sites rich in ANP, supporting our hypothesis (based on morphological findings) that the OT system works in the heart via stimulation of ANP release (7).

OT influence on RA-mediated cardiomyocyte differentiation of P19 cells. To identify the functionality of RA-induced effects on the OT system in the developing heart, we performed experiments of cardiomyocyte differentiation. As presented in Figure 3.6A, RA at 10^{-8} and 10^{-7} M concentrations induced cardiomyogenesis of P19 cells. RA, however, had relatively lower potency (4 times lower) compared to 10^{-7} M OT. RA-mediated cardiomyocyte differentiation of P19 cells was inhibited by the presence of 10^{-7} M OTA. OT treatment of P19 cells resulted in significantly higher OTR expression compared to RA treatment (Fig. 3.6B). Because both OT- and RA-induced increases in OTR mRNA expression were neutralized in the presence of OTA, these observations suggest that the level of OTR activation is a critical factor in the strength of cardiomyogenesis in P19 cells. As illustrated in Figure 3.6A treatments with both RA and OT similarly induced rhodamine¹²³ retention in differentiated P19 cells, indicating increased mitochondrial activities. This effect was abolished when these inducers were combined with OTA.

3.7. Discussion

In support of the action of OT in cardiomyogenesis, we found elevated OT and OTR protein levels in the fetal heart at E21 and postnatal days 1-4, when cardiac myocytes are at a stage of intense hyperplasia. ICC revealed that in the rat heart at PD 6 OTR were localized predominantly in atrial cardiomyocytes, but in the adult rat, intense OTR staining was observed in the endothelium of coronary arteries. OT transcripts in the fetal heart are sensitive to the stimulatory actions of RA, recognized as a major cardiac morphogen. Because OTA inhibited RA-mediated cardiomyocyte differentiation of P19 embryonic stem cells, the results support the hypothesis that RA induces cardiomyogenesis by activation of the cardiac OT system.

The importance of the OT system during rat development is validated by the observation that OT and OTR are expressed in the fetal rat heart and decreased to relatively low levels in adulthood. In rats, starting from E18, *in situ* hybridization studies localized OT neurons in the dorsal portion of the supraoptic nucleus of hypothalamus, while its ventricular portion is occupied by arginine vasopressin neurons. Less OT-labeled cells were found in the developing paraventricular nucleus (22). OT-specific binding sites were detected first in the brain at E14 and prior to OT expression (23). Even after OT is expressed in the fetal rat brain, OT peptide precursor is not completely processed to OT nanopeptide until after birth (24). Our data suggest that cardiac OT is functional in fetal life, which contrasts with low OT synthesis (25), and the low concentration of biologically-active OT in the hypothalamus, as we are reporting here. It might be speculated that OT production in the heart during fetal life and early maturation can supplement low OT production in hypothalamic nuclei. This is indicated by high OT plasma level in newborn rats exceeding those in adult rats (26).

Identification of OTR in the cardiomyocytes of newborn rats supports the hypothesis that OT plays a role in the development of these cells. However, under our experimental conditions we failed to demonstrate immunoreactive OTR in the fetal heart in spite of evidence of OT binding sites in the fetal cardiac sections. It should be noted that OTR immunoreaction in cardiomyocytes is fixation-sensitive

and our attempts to detect immunoreactive OTR in the embryonic and early postnatal stages in immersion-fixed hearts were unsuccessful. We cannot provide results from perfused fetal cardiac tissue, but we can state with certainty that OTR immunoreaction, which was eminent in postnatal heart cardiomyocytes, declines with age to low levels in adults. Interestingly, in coronary vasculature, OTRs develop in endothelial cells postnatally, stained evidently at PD 12 and 22, achieving a plateau in adult rats. These findings suggest that OT can be involved in developmental formation of the coronary vessels. Supporting this hypothesis Thibonnier et al., (27) have reported that OT stimulates proliferation of cultured endothelial cells.

OT differentiation capacity indicates its influence on cellular growth. Indeed, the anti-proliferative effect of OT, mediated by OTR, has been documented in breast cancer cells (28) and other tumours (29, 30). In contrast to its action on tumoural cells, a mitogenic action of OT has been described in myometrium via phosphorylation and activation of mitogen-activated protein kinase (31). OT stimulates the proliferation of thymocytes (32, 33), the prostate epithelium (34), and trophoblasts (35). OT has also been reported to enhance myoepithelial cell differentiation and proliferation in the mouse mammary gland (36). OT increases the rate of myoblast fusion and myotubule formation (37). Interestingly, most transcription factors identified so far in the heart are also present in other muscle cells, and myoblast transplantation to the injured heart improves regional systolic heart function (38). Assuming similarities in the differentiation mechanisms of skeletal and cardiac muscles and the expression (15) of both OT and OTR in these cells (8, 37), we can speculate that OT play a role in cardiac muscle regeneration.

The P19 mouse embryonal carcinoma cell line gives rise to the formation of cell derivatives of all 3 germ layers and appears to differentiate via the same mechanisms as normal embryonic stem cells (11). The cardiomyogenic capacity of RA suggests that transcription factors of the steroid-thyroid-RA superfamily could be involved in the cardiac differentiation of P19 cells (39). RA, the active form of vitamin-A (retinol), regulates vertebrate growth and development. RA receptors mediate RA-induced expression of genes with roles in cell differentiation. Likewise,

cardiac malformations are observed in the developing heart of vitamin-A-deficient rats, and these defects can be prevented by vitamin-A administered to pregnant dams at specific times during gestation (40). Excess RA can also cause heart defects, and malformations of cardiac structures are often formed in infants whose mothers took vitamin-A analogue, 13-cis-RA, during the first week of pregnancy (41). Experiments have shown also the ability of T3 to induce cardiomyogenesis (42) via specific thyroid receptor influencing gene expression of P19 cells (43). We have evidence that this reaction is inhibited by OTA. However, the mechanisms responsible for triggering cardiomyogenic genes by RA and T3 in the embryonal cells are still unknown, as is the mode of OT action with respect to the cardiomyogenic programme in P19 cells.

Evidence that OT plays a physiological role in fetal life and the early postnatal period is sparse and controversial. Exogenously-induced OT elevation has been reported to impair the development of rat offspring at birth and during postnatal stages (44). In this context, OT has been shown to influence the developing heart: OT administered in excess to the fetus may inhibit cardiac growth in humans and rats (45, 46). On the other hand, OTR suppression by OTA in the early stage of chicken egg development leads to cardiac malformation in the embryos, which suggests OT's importance in the cardiac development of birds (47). More recent findings indicate that early postnatal OT administration in the rat has life-long effects, resulting in increased body weight, body fatness in adulthood, and, interestingly a life-long decline of arterial blood pressure (48).

In summary, the present study demonstrates that the OT system in the heart is upregulated in the fetus at term and in the early postnatal period and sensitive to RA actions during fetal life. Correspondingly, the RA effect leading to differentiation of P19 cells into a cardiomyocyte phenotype is mediated by the OT system. Assuming that the OT system is functional in somatic stem cell precursors capable of differentiating into cardiomyocytes we suggest that OT has potential in cardiomorphogenesis or cardioregenerative activities.

Acknowledgments

We acknowledge the editorial work done on this manuscript by Mr. Ovid Da Silva, Editor, Research Support Office, Research Centre, CHUM. Also, we acknowledge the secretarial assistance of Mrs. Antoinette Paolitto. Grants of the Canadian Institutes of Health Research and Canadian Heart and Stroke Foundation (MOP-53217, to J.G. and M.J.; NET SRD-63193 to J.G., M.J. and J.P.; MOP 62926 to P.B.), and National Institutes of Health Grant MH-51853 (to S.M.M.) supported this work.

3.8. References

1. Gimpl, G. & Fahrenholz, F. (2001) *Physiol. Rev.* **81**, 629-683.
2. McCann, S.M., Antunes-Rodrigues, J., Jankowski M. & Gutkowska J. (2002) *Progr. Brain Research* **130**, 309-328.
3. Antunes-Rodrigues, J., de Castro., M, Elias, L.L., Valenca, M.M., McCann, S.M. (2004) *Physiol. Rev.* **8**, 169-208.
4. Petersson, M., Alster P., Lundberg, T. & Uvnas-Moberg, K. (1996) *Physiol. Behav.* **60**, 1311-1315.
5. Favaretto, A. L., Ballejo, G. O., Albuquerque-Araujo, W. I., Gutkowska, J., Antunes-Rodrigues, J. & McCann, S. M. (1997) *Peptides* **18**, 1377-1381.
6. Haanwinckel, M. A., Elias, L. K., Favaretto, A. L., Gutkowska, J., McCann, S. M. & Antunes-Rodrigues, J. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 7902-7906.
7. Gutkowska, J., Jankowski, M., Lambert, C., Mukaddam-Daher, S., Zingg, H. H. & McCann, S. M. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 11704-11709.
8. Jankowski, M., Hajjar, F., Al Kawas, S., Mukaddam-Daher, S., Hoffman, G., McCann, S. M. & Gutkowska, J. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 14558-14563.
9. Gutkowska, J., Jankowski, M., Mukaddam-Daher, S., McCann, S.M. (2000) *Braz. J. Med. Biol. Res.* **33**, 625-633.
10. Paquin, J., Danalache, B.A., Jankowski, M., McCann, S.M. & Gutkowska, J. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 9550-9555.
11. der Heyden, M.A.G., van & Defize, L.H.K. *Cardiovasc. Res.* (2003) **58**, 292-302.
12. Matsuura, K., Nagai, T., Nishigaki, N., Oyama, T., Nishi, J., Wada, H., Sano, M., Toko, H., Akazawa, H., Sato, T., Nakaya, H., Kasanuki, H., Komuro, I. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 11384 - 11391.
13. Richard, S., Zingg, H.H. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 21428-21433.
14. Larcher, A., Neculcea, J., Chu, K., Zingg, H.H. (1995) *Mol. Cell. Endocrinol.* **114**, 69-76.
15. Heng, B.C., Haider, H.K., Sim, E.K-W., Cao, T., Ng, S.C. *Cardiovasc. Res.* (2004) **62**, 34-42.

16. Engelmann, G.L., Boehm, K.D., Birchenall-Roberts, M.C., Rusetti, F.W. (1992) *Mech. Dev.* **38**, 85-97.
17. Reiss, K., Cheng, W., Ferber, A., Kajstura, J., Li, P., Li, B., Olivetti, G., Homcy, C.J., Baserega, R., Anversa, P. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 8630-8635.
18. Yu X., Lin, C-S., Costantini, F., Noguchi, T. (2001) *Blood* **98**, 475-477.
19. Wang D., Marcinkiewicz, M., Rachelska, G., Gutkowska, J. & Jankowski, M. (2003) *Cardiovasc. Res.* **57** 186-194.
20. Rudnicki, M. A. & McBurney, M. W. (1987) in *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, ed. Robertson, E. J. (IRL Press, Oxford), pp. 19-49.
21. Labrecque, J., Dumas, F., Lacroix, A., Bhat, P.V. (1995) *Biochem. J.* **305**, 681-684.
22. Trembleau A, Ugrumov M, Roche D, Calas A. (1995) *Brain Res Bull.* **37**, 437-48.
23. Tribollet, E., Charpak, S., Schmidt, A., Dubois-Dauphin, M. & Dreifuss, J.J. (1989) *J. Neurosci.* **9**, 1764-1773.
24. Alstein, M, Whitnall, M.H., House, S., Key, S., Gaine,r H. (1988) *Peptides* **9**, 87-105.
25. Almazan, G., Lefebvre, D.L. & Zingg, H.H. (1989) *Dev. Brain Res.* **45**, 69-75.
26. Hartman, R. D., Rosella-Dampman, L. M., Emmert, S. E. & Summy-Long, J. Y. (1986) *Endocrinology* **119**, 1-11
27. Thibonnier, M., Conarty, D. M., Preston, J. A., Plesnicher, C. L., Dweik, R. A. & Erzurum, S. C. (1999) *Endocrinology* **140**, 1301-1309.
28. Cassoni, P., Sapino, A., Fortunati, N., Munaron, L., Chini, B. & Bussolati, G. (1997) *Int. J. Cancer* **72**, 340-344.
29. Cassoni, P., Sapino, A., Stella, A., Fortunati, N. & Bussolati, G. (1998) *Int. J. Cancer* **77**, 695-700.
30. Cassoni, P., Fulcheri, E., Carcangiu, M. L., Stella, A., Deaglio, S. & Bussolati, G. (2000) *J. Pathol.* **190**, 470-477.
31. Ohmichi, M., Koike, K., Nohara, A., Kanda, Y., Sakamoto, Y., Zhang, Z.X., Hirota, K., Miyake, A. (1995) *Endocrinology* **136**, 2082-2087.

32. Martens, H., Kecha, O., Charlet-Renard, C., Defresne, M. P. & Geenen, V. (1998) *Neuroendocrinology* **67**, 282-289.
33. Geenen, V., Kecha, O., Brilot, F., Charlet-Renard, C. & Martens, H. (1999) *Neuroimmunomodulation* **6**, 115-125.
34. Plecas, B., Popovic, A., Jovovic, D. & Hristic, M. (1992) *J. Endocrinol. Invest.* **15**, 249-253.
35. Cassoni, P., Sapino, A., Munaron, L., Deaglio, S., Chini, B., Graziani, A., Ahmed, A. & Bussolati, G. (2001) *Endocrinology* **142**, 1130-1136.
36. Sapino, A., Macri, L., Tonda, L. & Bussolati, G. (1993) *Endocrinology* **133**, 838-842.
37. Breton, C., Haenggeli, C., Barberis, C., Heitz, F., Bader, C.R., Bernheim, L., Tribollet, E. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* (2002) **87**, 1415-1418.
38. Thompson, R.B., Emani, S.M., Davis, B.H., van den Bos, E.J., Morimoto, Y., Craig, D., Glower, D., Taylor, D.A. (2003) *Circulation* **108**, Suppl 1 II, 264-271.
39. Edwards, M.K.S., McBurney, M.W. (1983) *Dev. Biol.* **98**, 187-191.
40. Wilson, J.G., Roth, C.B., Warkanay, J. (1953) *Am. J. Anatomy* **92**, 189-217.
41. Lammer, E.J., Chen, D.T., Hoaer, R.M., Agnish, N.D., Benke P.J., Braun, J.T., Curry C.J., Fernhoff, P.M., Grix, A.W., Jr., Lott, I.T. (1985) *New Engl. J. Med.* **313**, 837-841.
42. Rodriguez, E.R., Tan, C.D., Onwuta, U.S., Yu, Z.X., Ferrans, V.J., Parrillo, J.E. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **205**, 652-658.
43. Rodriguez, E.R., Tan, C.D., Onwuta, U.S., Parrillo J.E. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **205**, 1899-906.
44. Boer, G.J. (1993) *Neurotoxicol. Teratol.* **15**, 383-389.
45. Chard, T., Boyd, N. R., Forsling, M. L., McNeilly, A. S. & Landon, J. (1970) *J. Endocrinol.* **48**, 223-234.
46. Schriefer, J.A., Lewis, P.R. & Miller, J.W. (1982) *Biol Reprod* **27**, 362-368.
47. Widmer, H., Durroux, T., Kempf, H., Mouillac, B., Gasc, J. M. & Barberis, C. (1999) *Abstracts of 1999 World Congress on Neurohypophysial Hormones* 94.

48. Olausson, H., Uvnäs-Moberg, K. & Sohlström, A. (2003) *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **284**, E475-E480

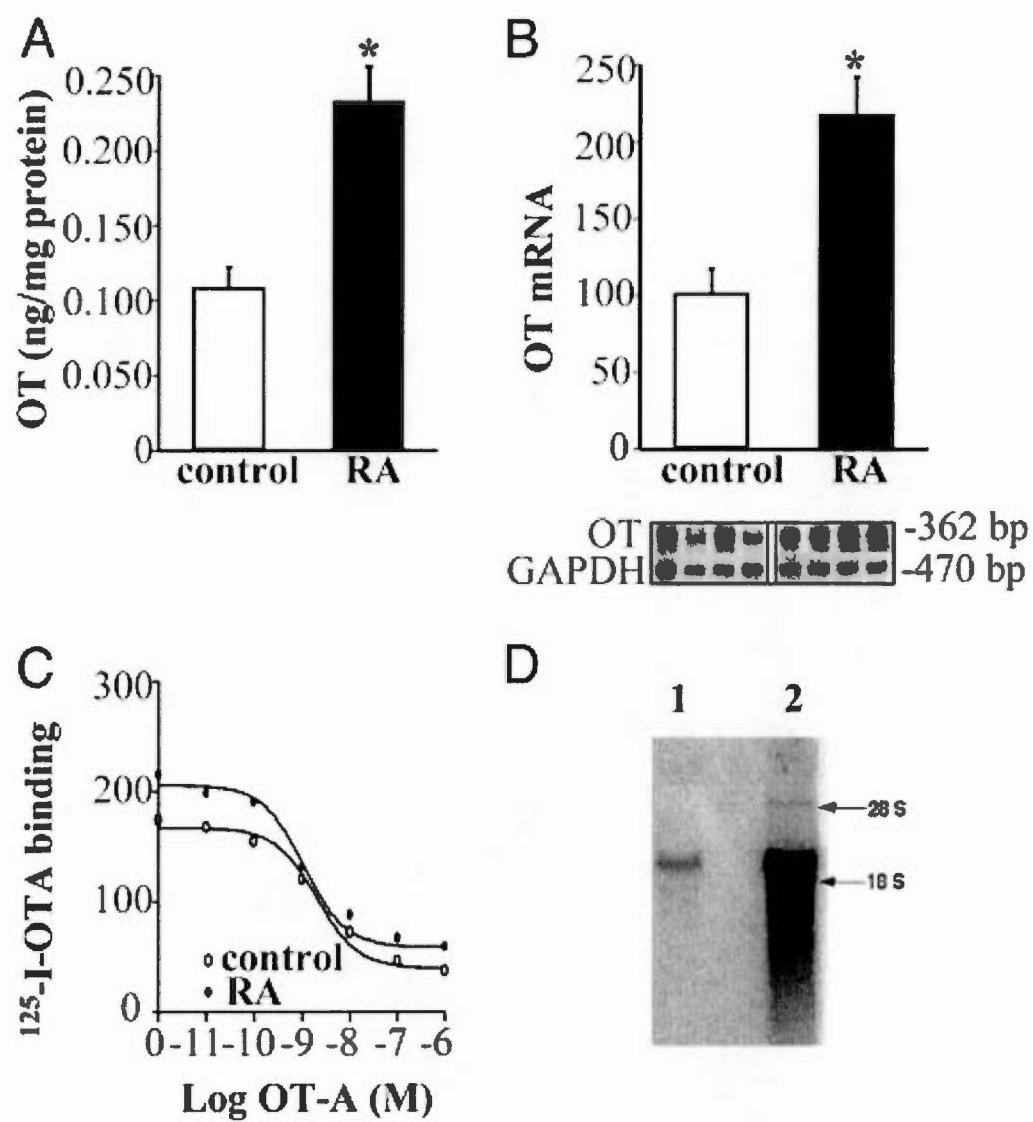


Figure 3.1

Figure 3.1. *In vivo* effect of retinoic acid (RA) in the fetal heart (E21) on oxytocin (OT) concentration measured by radioimmunoassay (RIA) (**A**, n=11, *P<0.05) and OT mRNA as shown by semiquantitative RT-PCR (**B**, n=8, *P<0.05). (**C**) ¹²⁵I-OTA binding to the fetal sections demonstrated by autoradiography. The representative competition curve of ¹²⁵I-OTA binding to the fetal heart sections by unlabelled OTA. (**D**) Retinal dehydrogenase type 1 mRNA detected by Northern blotting in the fetal heart (1) and kidney (2).

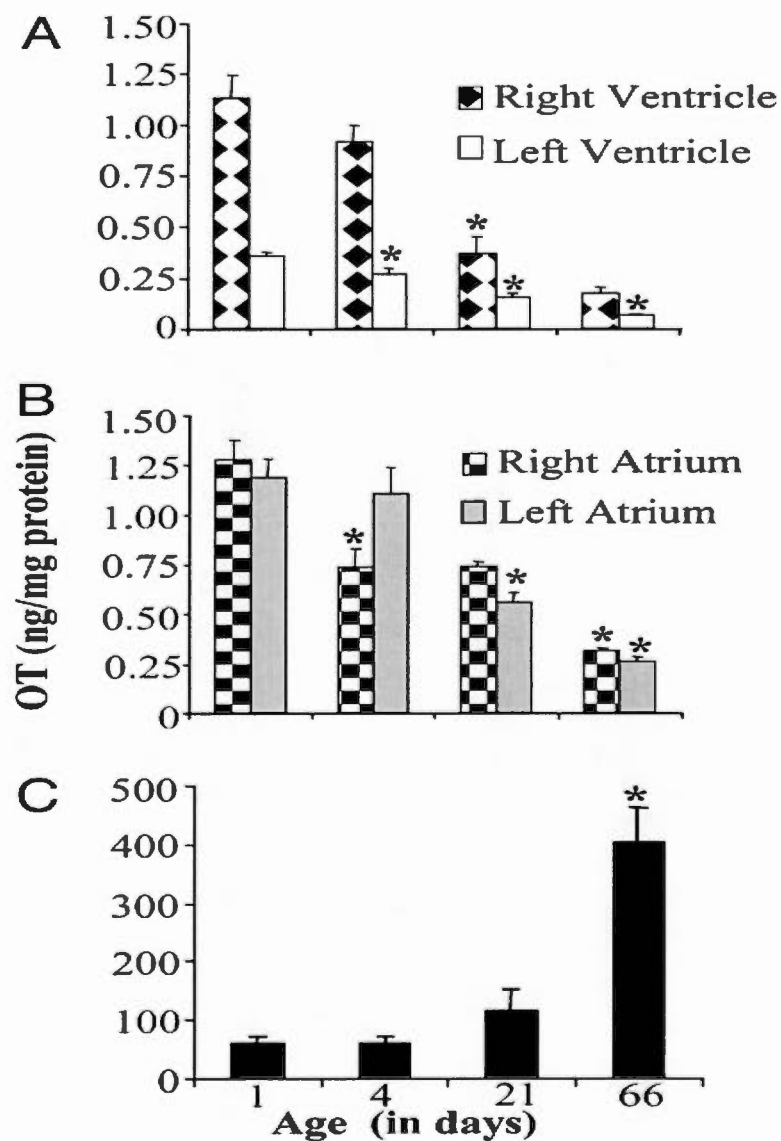


Figure 3.2. Changes in OT concentration during rat postnatal development measured by RIA in the heart chambers (**A**, ventricles; **B**, atria; $n=6-12$, $*P<0.05$, indicating increase vs. preceding age group) and (**C**) hypothalamus ($n= 6-8$, $*P<0.05$).

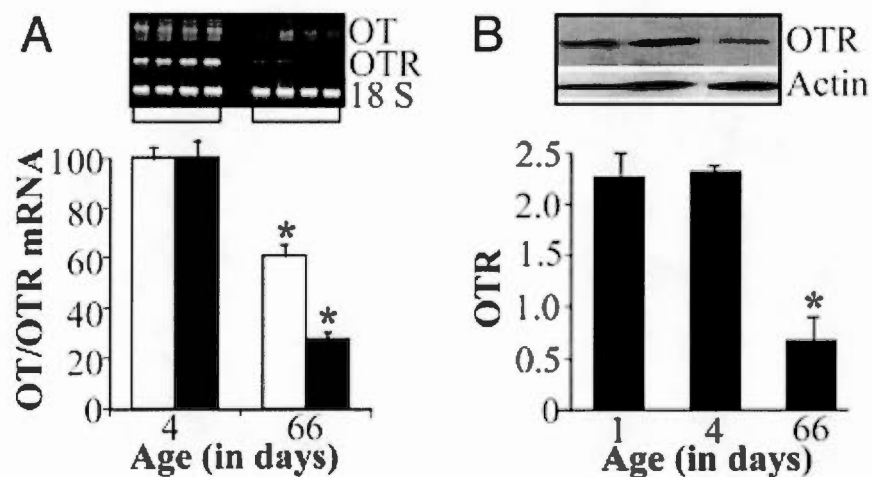


Figure 3.3. Atrial OT and OTR during rat maturation. **(A)** RT-PCR for OT (white bars) and OTR mRNA (black bars) in the left atria of newborn (postnatal day 4) and adult rats (postnatal day 66), $n=6$, $*P<0.05$. **(B)** Corresponding Western blot analysis of OTR expression (black bars) in the left atrium, $n=4$, $*P<0.05$.

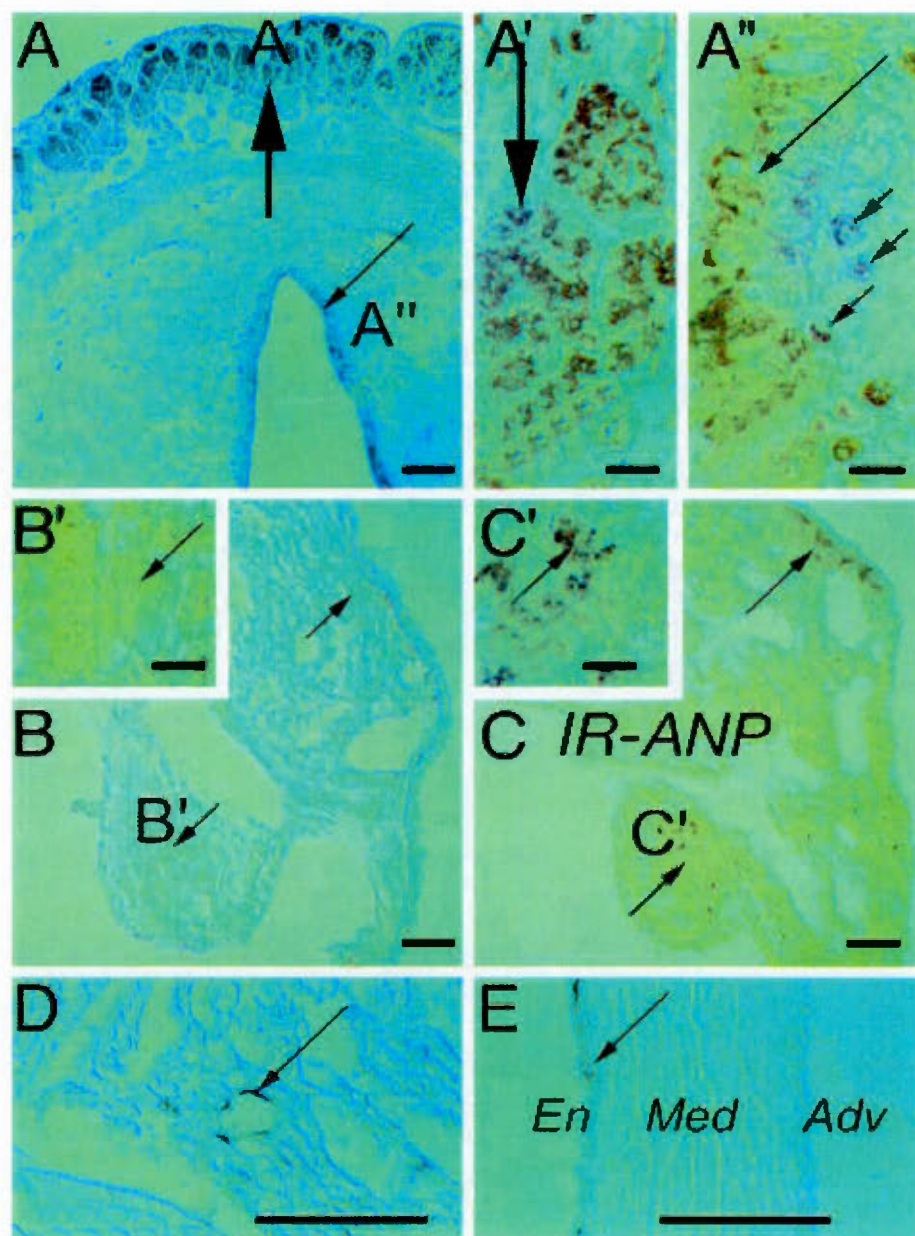


Figure 3.4.

Figure 3.4. OTR immunocytochemical staining (arrows) in adult rat fallopian tubes at low (**A**) and higher magnifications (**A'** and **A''**). Heavy arrows show smooth muscles; long thin arrows show epithelial cells and small arrows show stroma macrophages. OTR ICC sites (arrows) in atrial cardiomyocytes at low (**B**) and high magnification (**B'**) of a heart 6 day old rat. For comparison, ANP immunoreactivity (IR-ANP) is shown at low (**C**) and higher magnification (**C'**) of adjacent section. Adult rat atrium OTR ICC sites (arrows) are shown in (**D**), whereas coronary artery is in (**E**). Long arrows indicate endothelial cells. Abbreviations: Adv – tunica adventicia; En – endothelial cells; Med – tunica media. Magnifications: x 40 in *A*, *B* and *C*; x 405 in *A'*, *A''*, *B'* and *C'*; x 160 in *D* and *E*. Bar = 100 μ m in *A*, *B*, *C*, *D* and *E*; Bar = 10 μ m in *A'*, *A''*, *B'* and *C'*.

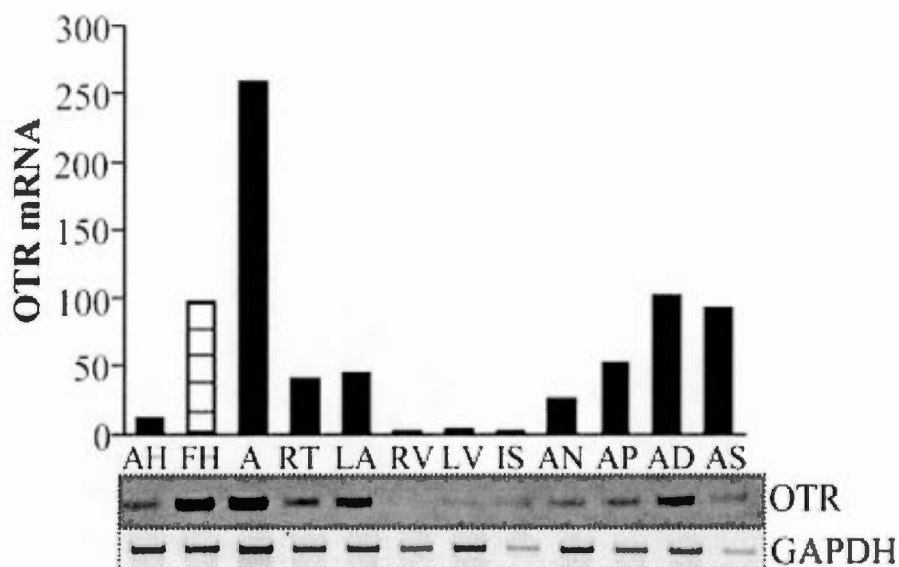


Figure 3.5. OTR mRNA expression in human adult (AH) and fetal heart (FH) detected by RT-PCR. The studies were performed in cDNA samples from human hearts (Human Cardiovascular System MTC Pannel No. 636749, BD Biosciences Clontech). Lower panel shows representative PhosphorImager scanned bands of PCR products amplified with specific primers for OTR and GAPDH used as internal standard. Upper panel displays the mean OTR value from three independent amplifications after adjusting the GAPDH value. Abbreviations: A - aorta, RT - right atrium, LA - left atrium, RV - right ventricle, LV - left ventricle, AN - atrioventricular node, IS - interventricular septum, AP - apex of the heart, AD - right auricle, AS - left auricle.

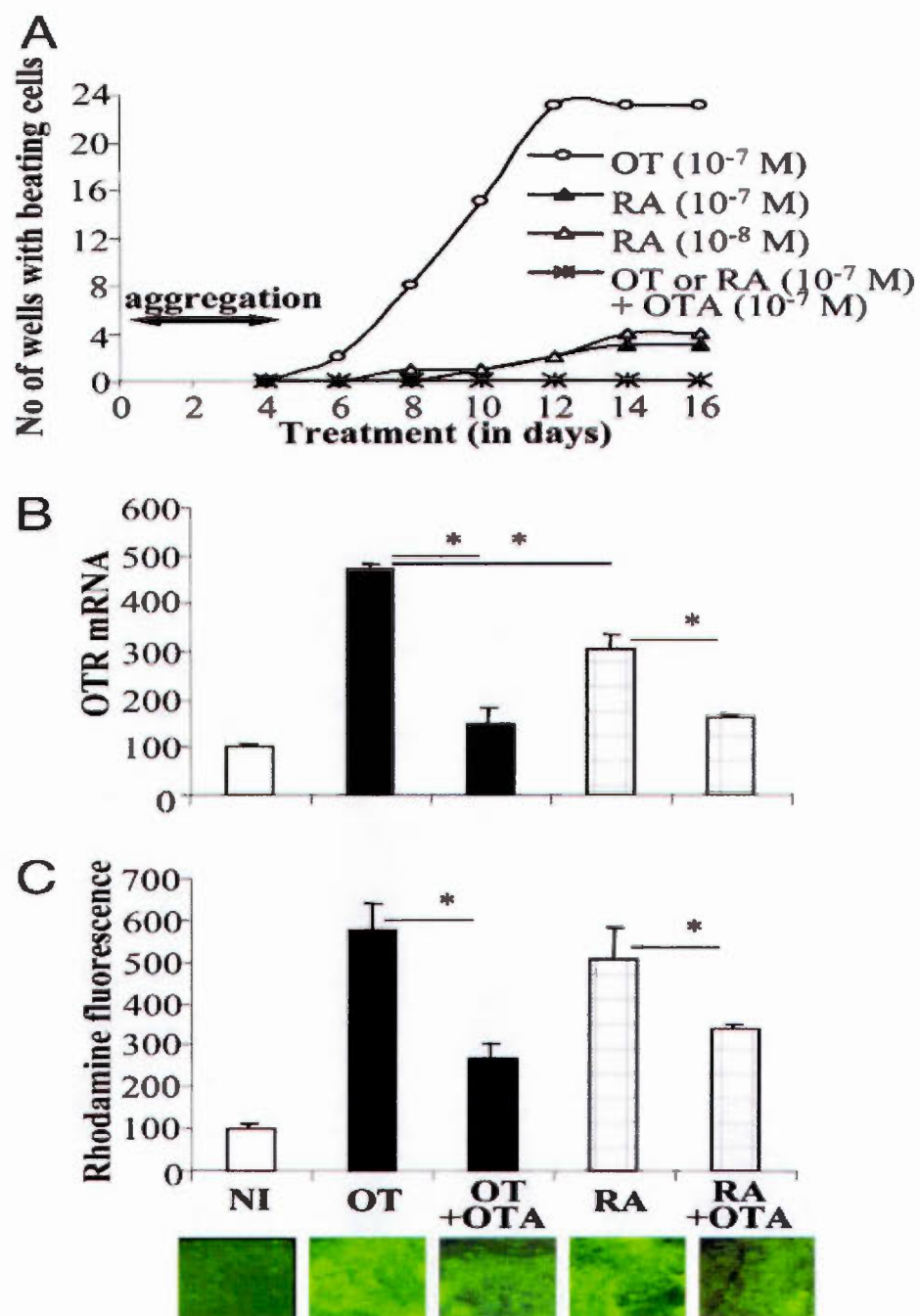


Figure 3.6

Figure 3.6 Cardiomyogenic effect of OT and RA in P19 cells is suppressed by OT antagonist (OTA). **(A)** Time course of appearance of beating cell colonies upon treatment with OT and RA in presence and absence of OTA. The number of wells containing beating cell colonies was calculated in 24-well tissue culture plate at 2-day intervals. The results are means of three independent differentiation experiments. **(B)** RT-PCR analysis of OT receptor (OTR) gene transcript in undifferentiated and induced cultures. Cell aggregates were exposed to OT (10^{-7} M) or RA (10^{-7} M) in the absence or presence of OTA (10^{-7} M) from day 0 to day 4, and RNA was extracted at day 14 of the differentiation protocol. OTR transcript was also evaluated in undifferentiated cells grown in monolayers (NI). Levels of OTR mRNA were adjusted by dividing by corresponding GAPDH mRNA and then expressed as the percentage of the NI value. Results are the means \pm SEM of five independent studies ($*P < 0.05$). **(C)** Monitoring of P19 cell differentiation into cardiomyocytes using selective vital staining with rhodamine¹²³ in non-induced and OT- RA-induced cultures. On day 8, the cells were stained for 45 min with rhodamine¹²³ (1 μ g/ml), washed, and again cultured without dye for 48 h. Then, the retained dye was fluorimetrically quantified for each well, and the results are reported as the means \pm SEM of 24 determinations ($*P < 0.05$).

Chapitre IV

LA SIGNALISATION DE L'OXYDE NITRIQUE DANS LA CARDIOMYOGÉNÈSE MÉDIÉE PAR L'OCYTOCINE

4.1. Explication de la contribution

Ce chapitre contient le manuscrit soumis à la revue *Stem Cells* par Bogdan A. Danalache, Joanne Paquin, Ryszard Grygorczyk, Jolanta Gutkowska et Marek Jankowski. B.A. Danalache comme premier auteur a fait toutes les expériences sauf le passage des cellules sur le cytomètre de flux et l'analyse des histogrammes. Par contre, Bogdan A. Danalache a mis au point la méthode de préparation de cellules pour la cytométrie en flux. Il a aussi participé à la rédaction du manuscrit.

4.2. Résumé

Objectif: L'ocytocine (OT), une hormone récemment identifiée dans le cœur, induit la différenciation en cardiomyocytes de cellules de carcinome embryonnaire de souris P19 et de cellules souches somatiques cardiaques de souris. L'oxyde nitrique (NO) a aussi des propriétés cardiomyogéniques. Nous avons étudié l'hypothèse que la cardiomyogénèse induite par OT est liée à NO. **Méthodes et résultats:** Les expériences ont été réalisées dans les cellules P19 et dans leurs dérivées clonales, P19 Clone 6, exprimant comme rapporteur la protéine à fluorescence verte GFP sous le contrôle transcriptionnel du promoteur de MLC-2v. La génération de cardiomyocytes a été analysée par morphologie, transcription inversée-PCR, fluorescence GFP et immunocytochimie. OT déclenche la formation de colonies de cellules battant robustement et cette action est inhibée par L-NAME, un inhibiteur non-spécifique des NO synthases (NOS). L-NAME diminue aussi les transcrits de

GATA4, de la NOS endothéliale et du peptide natriurétique auriculaire, ainsi que la fluorescence GFP, induits par OT. Les cellules stimulées avec OT expriment toutes les régions codantes du transcrit de OT, et L-NAME réduit l'ARNm de OT. Le S-nitroso-N-acétylpénicillamine, un générateur de NO, renverse l'effet inhibiteur de L-NAME sur les relevés de battements et la fluorescence GFP. Comme L-NAME, les composés 1400W (inhibiteur de la NOS inductible) et ODQ (inhibiteur de la guanylyl cyclase cible de la NOS endothéliale) réduisent la génération de colonies battantes induites par OT. Etonnamment, L-NAME seul réduit l'expression du marqueur antigène-1 spécifique du stade indifférencié (SSEA-1) et, comme 1400W et ODQ, stimule l'expression de GFP. Cependant, les cellules traitées avec L-NAME ne se différencient que marginalement en cardiomyocytes développés tel que révélé par la quasi absence de la chaîne lourde de la myosine sarcomérique et du récepteur des dihydropyridines en immunocytochimie. **Conclusion:** NO est un médiateur de la cardiomyogénèse induite par OT dans les cellules P19. En accord avec les actions duales de NO dans diverses situations, des niveaux minimaux de NO semblent nécessaires pour maintenir le caractère indifférencié.

Nitric Oxide Signaling in Oxytocin-mediated Cardiomyogenesis

Bogdan A. Danalache^{1,2}, Joanne Paquin^{1*}, Ryszard Grygorczyk², Jennifer C. Moore³,
Christine L. Mummery³, Jolanta Gutkowska², Marek Jankowski^{2*}

¹Laboratoire de neuroendocrinologie développementale, Département de chimie et de biochimie, Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec, Canada

²Centre de recherche, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM)-Hôtel-Dieu, Montréal, Québec, Canada

³Hubrecht Laboratory 1, University Medical Center, Utrecht, The Netherlands

* Address reprint requests to:

Marek Jankowski, Ph.D.

Centre de Recherche, CHUM-Hôtel-Dieu

Pav. de Bullion, 8e étage

3840, rue Saint-Urbain

Montréal, Québec, Canada H2W 1T8

Tel: 1 (514) 890-8000 Ext. 12757, Fax: 1 (514) 412-7199

e-mail: marek.jankowski@umontreal.ca

or

Joanne Paquin, Ph.D.

Département de chimie et de biochimie

Université du Québec à Montréal

C.P. 8888, Succ. Centre-ville

Montreal, Quebec, Canada H3C 3P8

Tel : 1 (514) 987-3000, ext 4990#; Fax : 1 (514) 987-4054

e-mail : paquin.joanne@uqam.ca

Key words: Cell differentiation, Cardiomyocytes, Hormones, Nitric oxide, Gene expression

4.3. Abstract

Objective: Oxytocin (OT), a hormone recently identified in the heart, promotes cardiomyocyte differentiation of mouse P19 embryonal carcinoma cells and cardiac somatic stem cells. Nitric oxide (NO) also has cardiomyogenic properties. We studied the hypothesis that OT-induced cardiomyogenesis is linked to NO. **Methods and results:** Experiments were performed in P19 cells and their clonal derivatives, P19 Clone 6, expressing a green fluorescent protein (GFP) reporter under the transcriptional control of the MLC-2v promoter. Cardiomyocyte generation was analysed by morphology, reverse transcription-PCR, GFP fluorescence and immunocytochemistry. OT triggered formation of robustly beating cell colonies that was inhibited by L-NAME, a non-specific inhibitor of NO synthases (NOS). L-NAME also decreased OT-induced GATA4, endothelial NOS and atrial natriuretic peptide transcripts, as well as GFP fluorescence. OT-stimulated cells expressed all coding regions of the OT transcript, and L-NAME reduced OT mRNA. S-nitroso-N-acetylpenicillamine, a NO generator, reversed the inhibitory effect of L-NAME on beatings scores and GFP fluorescence. Like L-NAME, the compounds 1400W (inhibitor of inducible NOS) and ODQ (inhibitor of endothelial NOS target guanylyl cyclase) decreased OT-induced generation of beating colonies. Surprisingly, L-NAME alone reduced expression of the pluripotency marker stage-specific embryonic antigen-1 (SSEA-1) and, like 1400W and ODQ, stimulated GFP expression. However, L-NAME-treated cells only marginally differentiate into developed cardiomyocytes as revealed by the almost absence of sarcomeric myosin heavy chain and dihydropyridine receptor by immunocytochemistry. **Conclusion:** NO mediates OT-induced cardiomyogenesis in P19 cells. In line with dual actions of NO in various situations, minimal NO levels seem necessary to maintain the undifferentiated state.

4.4. Introduction

In vitro differentiation of embryonic stem cells into cardiomyocytes (CM) is a poorly-defined, inefficient and relatively non-selective process [1]. One of the most studied pluripotent stem cells models is the mouse embryonal carcinoma (EC) cell line P19, which is easy to culture, amenable to genetic manipulation, and has a low frequency of spontaneous CM differentiation [2]. Differently to embryonic stem (ES) cells, they do not require addition of leukemia inhibitory factor (LIF) in culture medium to preserve their undifferentiated, pluripotent character. Embryoid body (EB) formation and exposure to various inducers promote the differentiation of P19 cells to the mesodermal or ectodermal lineages. Among the mesodermal derivatives formed in EBs, subtypes of cardiac cells (atrial CM, ventricular CM and pacemaker cells) were identified by histological, molecular and electrophysiological criteria [3]. Recently, a transgenic reporter cell line was derived from P19 Clone 6 (P19Cl6), which expresses green fluorescent protein (GFP) under the transcriptional control of the rat myosin light chain-2v (MLC-2v) promoter. This cell line facilitates quantification and if necessary selection of CM generated under a variety of differentiation conditions [4]. Identifying and optimizing these conditions is important for new approaches to probe the molecular mechanism of CM differentiation and apply this knowledge to producing CMs for cardiac therapy.

Oxytocin (OT), recently recognized as a cardiac hormone [5,6], is one of the most potent CM differentiation factors for P19 cells [7,8]. It also has the unique ability to stimulate CM differentiation of cardiac somatic stem cells [9]. This hormone, originally considered to be involved in uterine contraction and milk ejection, has broader physiological functions, including body fluid and cardiovascular homeostasis, cell growth and social behavior [10]. In P19 cells, OT induces beating CM formation earlier and more efficiently than dimethylsulfoxide (DMSO), a frequently-used, although not physiologically-relevant cardiomorphogen [7]. Both OT- and DMSO-specific treatments upregulate OT receptors in P19 cells during cell differentiation. Furthermore, an OT antagonist blocks not only OT-induced but also

DMSO-induced CM differentiation, suggesting that DMSO acts via the OT pathway. Interestingly, OT receptors have been implicated in retinoic acid-induced P19 CM differentiation as well [8]. The OT activated signal transduction pathway leading to this differentiation is unknown. Thibonnier et al. [11] have proposed that OT receptor activation in human endothelial cells elicits nitric oxide (NO). NO also mediates OT actions in the brain as well as in the hypothalamic/hypophyseal and cardiac systems [12-16]. Two studies, the first using L-NAME (N,G-nitro-L-arginine-methyl-ester) to inhibit NO synthases (NOSs) and the second employing S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP) as an exogenous source of NO, have demonstrated that NO is essential for optimal CM generation [17,18]. We hypothesize that OT receptor signaling is linked to NO in the process of differentiation of stem cells into CM. Experiments were performed on the original P19 cell strain and, in addition, on the P19Cl6-GFP reporter cell line.

4.5. Materials and Methods

Cell culture and differentiation. P19 cells were propagated and differentiated as described [7]. Briefly, cells were grown in complete α MEM consisting of α -modified Eagle's minimal essential medium (α MEM, GIBCO-BRL Burlington, Ontario, Canada) supplemented with 2.5% heat-inactivated fetal bovine serum, 7.5% heat-inactivated donor bovine serum (Cansera International, Rexdale, Ontario, Canada), and the antibiotics (GIBCO-BRL) penicillin (50 U/ml) and streptomycin (50 μ g/ml). The cultures were maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and passaged every 2 days. For differentiation, 0.25×10^6 cells were grown as aggregates for 4 days in bacteriological grade petri dishes (6 cm diameter) containing 5 ml complete α MEM in the absence (non-induced) or presence of inducers. At day 4, aggregates were transferred to tissue culture grade vessels (10 cm-diameter dishes or 24 well plates), and cultured in complete α MEM medium in the absence of inducers until day 14 or 16 (with day 0 corresponding to the start of aggregation). P19Cl6-GFP cells [4] differentiation was carried out similarly to P19 cells, except that cell aggregation was initiated in hanging drops from day 0 to day 2. Inducers, used alone or in combination, were: OT (Peninsula Laboratories, San Carlos, CA), 10^{-7} M; DMSO (Sigma-Aldrich, Ontario, Canada), 0.5% v/v; N,G-nitro-L-arginine-methyl-ester (L-NAME; Research Biochemicals Inc. Natick, MA), 10^{-4} M; S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP; Sigma-Aldrich), 200 μ M; N-(3-[aminomethyl]benzyl)acetamidine (1400W; Sigma-Aldrich), 10 μ M; and 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ; Sigma-Aldrich), 10 μ M. The compounds L-NAME, SNAP, 1400W and ODQ did not affect cell viability in the conditions used as assessed by staining with acridine orange and propidium iodide [19].

Microscope analysis. Cellular morphology and GFP fluorescence were examined with an inverted microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany) equipped for epifluorescence analysis. Micrographs were taken with a Nikon Coolpix 5000

camera. GFP fluorescent areas on micrographs were analyzed with ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) using threshold function. Immunocytochemistry was carried out as described [7,20]. The mouse monoclonal antibody IgM anti-SSEA-1 (stage-specific embryonic antigen-1) was obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank under the auspices of the National Institute of Child Health & Human Development and maintained by the University of Iowa, Department of Biological Sciences, Iowa City, IA. The goat polyclonal antibodies IgG anti-sarcomeric myosin heavy chain (MHC; antibody K-16) and IgG anti-dihydropyridine receptor- α 1 (DHPR; antibody N-19) were from Santa Cruz Biotechnology Inc., CA. Secondary antibodies were conjugated to fluorescein.

Flow cytometry analysis. P19Cl6-GFP cells were carefully removed from culture dishes by treatment with Accutase (Innovative Cell Technologies Inc., San Diego, CA), washed and suspended in phosphate-buffered saline. GFP-emitting cells were quantified by passage in a FACS Aria TM Cell Sorter (BD Bioscience, Mississauga, ON, Canada) equipped with software for data analysis.

OT radioimmunoassay (RIA). P19 cultures induced with OT or DMSO were incubated with fresh α MEM for 4 h. At the end of incubation, the culture media were collected and directly analysed for OT concentration by RIA as described previously [6]. Culture medium not exposed to cells served as a control. The antibody, specific for OT nonapeptide (a generous gift from Dr. M. Morris, Wright State University, Dayton, OH), and synthetic OT standards (Peninsula Laboratories) were used to measure OT concentration.

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Total RNA was extracted from cells with TRIzol reagent (Invitrogen Life Technologies, Burlington, Ontario, Canada). For OT transcript analysis, poly(A)⁺mRNA was affinity purified on Oligotex mRNA columns (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada), and mRNAs for endothelial NOS (eNOS), GATA4 and atrial natriuretic peptide (ANP) were analysed in DNase-treated samples of total RNA (Turbo DNase-free Ambion Inc.). The

samples were then reverse transcribed to cDNA, amplified by PCR (Robocycler Gradient 40 Thermocycler, Stratagene, La Jolla, CA), and resolved on agarose gel. The bands stained by ethidium bromide were analyzed with the Storm 840 imaging system and ImageQuant software (Molecular Dynamics, Inc., Sunnyvale, CA). To validate the use of this RT-PCR assay as a tool for the semiquantitative measurement of mRNA, dose-response curves were established for different amounts of total RNA extracted from the P19 cells, and the samples were quantified in the linear phase of PCR amplification. These data were normalized to the corresponding values of 18S RNA PCR products used as the internal controls (Ambion, Austin, Tx). The PCR primers and conditions are shown in Table 1. Sequences of mouse ANP genes have been described [7]. The conditions for RT-PCR analysis of mouse GATA4 were adapted from Nemer and Nemer [21]. The OT-specific primer sequence has been reported by Lefebvre et al. [22]. OTA⁺ was a sense-strand primer corresponding to a sequence in exon A, starting 3 base pairs downstream of the initiation codon. OTB⁺ and OTB⁻ primers were sense- and antisense-strand primers located at the 5' and 3' ends of exon B, respectively. OTC⁻ was an antisense primer complementary to a sequence in exon C, terminating at the stop codon. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene expression was used as an internal standard measure in this experiment.

Cell proliferation. P19 cells were seeded in 24-well plates (5×10^3 cells/well) and cultured for 48 h in complete α MEM medium in the absence or presence of agents. Cells were fixed in para-formaldehyde, stained with crystal violet (Sigma-Aldrich), and absorbed dye was extracted with 10% acetic acid in water and quantified spectrophotometrically at 595 nm [23].

Statistical analysis. Values are expressed as mean \pm standard error to the mean (SEM). Comparisons were made using ANOVA, followed by Dunnett's modified t-test or in the case of comparison with only 1 group, by Student's t-test.

4.6. Results

L-NAME inhibits appearance of beating cell colonies in OT-induced P19 cultures.

Cardiomyogenesis was followed by counting wells that contained beating cell colonies. This simple means does not report the total number of beating colonies, and a well will score positive whether it contains one small colony or many big colonies. However, the likelihood of finding a beating colony increases with the size and the number of colonies. To complement information obtained by this assay, we provide in the text qualitative appreciation on the frequency and size of colonies.

Treatment of P19 cell aggregates with 10^{-7} M OT induced beating cell colonies earlier and in higher numbers than treatment with 0.5% DMSO (Fig. 4.1A) in 3 independently-growing cell cultures by day 14 (20 ± 0.3 vs. 14 ± 0.7 , respectively; $p < 0.05$). No beating cells were seen in OT-induced cultures in combination with 10^{-4} M L-NAME, a non-specific inhibitor of NOS but with greater affinity for eNOS [24,25]. L-NAME supplementation significantly reduced the number of beating colonies but did not completely abolish the cardiac differentiation evoked by DMSO (to 7 ± 2.0 ; $p < 0.05$).

Beating colonies had a different morphology after the various treatments. As seen in Figures 1C and 1F, OT and DMSO induced spherical beating cell colonies, which later transformed into fibers, both displaying robust, synchronized contractions. Beating colonies were absent in non-induced cultures (Fig. 4.1B) and in cultures treated with OT+L-NAME (Fig. 4.1D). Some round clusters of weakly-beating cells, although very rare and small, were seen when L-NAME was used alone (Fig. 4.1E, Multimedia Materials). L-NAME impaired but not completely abolish the cardiomyogenic action of DMSO since few clusters of frequently-beating cells were observed in DMSO+L-NAME-treated cultures (Fig. 4.1G).

Changes in GATA4, eNOS and ANP transcripts during OT-mediated P19 cell differentiation. Changes in GATA4 expression were in early indicator of OT-mediated cardiomyogenesis (Fig. 4.2). The results in Figure 2A demonstrated that in

P19 cells exposed to OT, GATA4 mRNA was already increased in aggregates at the 4th day of differentiation (5-fold increment compared to day 1). A further elevation of GATA4 mRNA was seen at day 6 (10-fold) when the first beating cell colonies were detected. Maximally-increased GATA4 mRNA (15-fold) was evident at days 10 and 14. Unexpectedly, in cells exposed to OT+L-NAME or L-NAME alone, GATA4 mRNA expression was also detected, although at a relatively lower level. In L-NAME-treated cells, a 6-fold GATA mRNA increment was noted at day 10.

As shown in Figure 2B, eNOS mRNA was barely detectable in cell aggregates induced by OT in the presence or absence of L-NAME. Interestingly, in OT-induced cultures, the first appearance of beating cell colonies (day 6) was associated with high eNOS mRNA expression (30 times greater than in cultures at day 1) which remained static through days 10 and 14. At day 6, the eNOS mRNA level was relatively low in cells exposed to OT+L-NAME or L-NAME alone. However, at days 10 and 14, eNOS expression was significantly augmented in OT+L-NAME-induced cells and to a lesser extent in cells exposed to L-NAME alone.

ANP mRNA increased progressively until day 10 in cells exposed to OT (Fig. 4.2C). In contrast to effective beating cell inhibition, L-NAME had no important impact on OT-induced ANP mRNA up-regulation. Interestingly, a high ANP mRNA level was found in L-NAME-treated cultures displaying a few foci of beating cells, indicating a cardiomyogenic process in NO-deficient cells.

Endogenous OT expression in P19 cells. We have already reported that rat CM express OT [6]. Using RIA, we investigated whether P19 cardiomyogenesis is associated with OT production in differentiated P19 cells. At day 14 of the OT-stimulated differentiation protocol, OT was measured 4 h after the addition of fresh medium. We detected 6.2 ± 0.2 pg of OT/mg protein in cell extracts and 14.2 ± 0.8 pg/ml in culture medium. Less OT was found in DMSO-stimulated P19 cells: 3.7 ± 0.1 pg/mg protein in cell extracts and 7.0 ± 0.1 pg/ml in medium. Since the contribution of serum-containing culture medium was only 1.1 ± 0.04 pg/ml, these results indicate that P19 cells differentiated into CM produce OT. The presence of OT transcript in OT-stimulated P19 cells at a period preceding the appearance of

beating colonies (day 6 of the differentiation protocol, Fig. 4.3) further indicates OT synthesis in these cells. In a series of experiments, RT-PCR was performed with OT gene-specific primers homologous to sequences on 3 exons of the OT gene, as represented schematically in Figure 3. This strategy was chosen to reveal any structural differences in endogenous OT expression that might exist between the OT-coding regions in P19 cells. The results showed that OT-stimulated P19 cells expressed all coding regions of OT transcript. Secondly, cell treatment with L-NAME significantly reduced OT mRNA in OT-induced P19 cells.

OT-mediated CM differentiation in the P19Cl6-GFP reporter cell line. To monitor the cardiomyogenesis of P19 cells quantitatively, sensitively and easily, we performed experiments on a newly-developed reporter cell line. The differentiated cells are distinguished as CM or non-CM cells by a GFP reporter under the transcriptional control of the 250-bp MLC-2v promoter expressed in P19 cells [4]. An enhancer element of the cytomegalovirus immediate early promoter was linked to the 5'-end of the MLC-2v-GFP construct to increase GFP detection [4]. These characteristics in conjunction with the MLC-2v gene being a marker of embryonic CM [26] permit to follow cardiac differentiation more easily than, but as sensitively as, with time-consuming PCR assays. In these reporter cells, GFP expression indicate cardiomyogenesis of ventricular phenotype. As illustrated in Figure 5, at day 6 of differentiation, when the first beating cells were detectable, flow cytometry revealed a low number of fluorescent cells in non-induced cultures of P19Cl6 cells (1%). OT (25%) and DMSO (23%) effectively stimulated GFP-expressing cells. L-NAME treatment alone also induced GFP-positive cells (16%), but reduced, by half, the number of fluorescent cells in cultures stimulated by OT (to 12%). These GFP results being in accordance with those obtained by PCR (Fig. 4.2) and beatings scores (Fig. 4.1A) pruned us to use the P19Cl6-GFP cell line to further investigate relationships between NO and OT in cardiomyogenesis.

SNAP reverses the inhibitory effect of L-NAME on OT-induced cardiomyogenesis. The scoring of beating colonies in P19Cl6-GFP cultures (Fig.

4.5A) confirmed results obtained in the parental P19 line (Fig. 4.1A): OT induced generation of beating colonies more efficiently than DMSO (24 vs. 21 wells at day 14), L-NAME reduced OT cardiomyogenic action (from 24 to 5 wells) and exhibited small cardiomyogenic properties by itself (7 wells). In contrast to what observed in P19 cells (0 well), the NI treatment generated some, yet very rare and small, beating clusters in P19Cl6-GFP cells (2 wells). The difference could be attributed to the fact that the P19Cl6 subline, although not committed to mesodermal lineage, is thought to represent a developmental stage closer to differentiated CM than the P19 parental line [27]. SNAP, a NO generator, had important cardiomyogenic properties (18 wells), in accordance with results of Kanno et al [18] obtained in ES cells. It is noteworthy that the beating colonies induced by SNAP were of a smaller size than those induced by OT or DMSO (data not shown), and the combination of OT+SNAP did not induce more beating colonies than OT alone (Fig. 4.5A). The number of wells with contracting cells (17 wells) increased when differentiation was induced by OT+L-NAME supplemented with SNAP as compared with OT+L-NAME treatment (5 wells), but was still lower than in cells induced by OT. SNAP thus partially reversed the inhibitory effect of L-NAME on OT-induced cardiomyogenesis.

Fluorescence microscopy was employed in the place of flow cytometry to visualize GFP staining intensity and distribution in response to the differentiation inducers studied. Figure 5 (B-I) shows fluoromicrographs taken at day 10 of differentiation treatments. Only basal fluorescence was seen in non-induced cultures (Fig. 4.5B). OT-treated cultures produced intense fluorescence areas of GFP (Fig. 4.5C) and similar but less intense staining was seen in cells induced with DMSO (Fig. 4.5I). OT induction of GFP-expressing cells was reduced in the presence of L-NAME, confirming that OT-mediated cardiomyogenesis comprises, at least in part, NO signaling (Fig. 4.5D). Fluorescence was also evident in some dispersed cell clusters responding to L-NAME during differentiation induction (Fig. 4.5E). The NO donor SNAP, given to the EBs during the induction phase, partially reversed the inhibitory effect of L-NAME on OT-induced CM differentiation (Fig. 4.5F). SNAP exhibited large areas of weak fluorescence studded with intensively emitting spots (Fig. 4.5G) that enlarged upon combination with OT treatment (Fig. 4.5H). High

fluorescence-emitting areas such as those seen in OT-differentiated cultures overlapped the sites of contracting cell colonies (Fig. 4.5C, Multimedia Materials). In contrast, areas of weak fluorescence were not always associated with beatings (e.g. OT+L-NAME, Fig 5D). The evaluation of fluorescence areas (Fig. 4.5J) illustrates the cardiomyogenic action of OT, SNAP and DMSO, the inhibition of OT action by L-NAME, and the partial rescuing of L-NAME inhibition by SNAP. One observation merits comment. We found higher percentages of GFP emitting cells in flow cytometry analysis as compared with areas evaluation (Figs. 4G vs. 5J). This discrepancy would be due to the interference of necrosis. Necrotic processes occur in aggregates and are known to be instrumental for efficient cardiomyogenesis. While necrotic cells and debris are discarded in flow cytometry analysis, they occupy spaces in cultures examined under the microscope. Another element of difference between the two analytical strategies resides in the use of individualized cells in flow cytometry while cells could pile up in dense cultures giving rise to limited deployment under the microscope (confluences were as shown in Fig. 4.1).

Other inhibitors of NO pathways also decrease OT-induced cardiomyogenesis.

To further confirm the involvement of NO in OT-induced cardiomyogenesis, we also studied effect of two other inhibitors of NO/NOS pathways, namely 1400W, a specific inhibitor of inducible NOS (iNOS) [28] and ODQ, an inhibitor of soluble guanylyl cyclase, an important target of eNOS [29]. Figure 6A shows that each inhibitor when combined with OT diminished the number of contractile cultures observed with OT treatment alone (OT: 15 wells at day 14, OT+1400W: 6 wells, and OT+ODQ: 7 wells). Reminiscent of L-NAME effect, each inhibitor also generated beating colonies in absence of OT. In this series of experiments, only OT produced large beating colonies, all other treatments generated very few and small contracting clusters. The results of beatings scores supported the evaluation of GFP fluorescence areas in these cultures, where GFP is used as an early marker, and beating as a marker of a more developed phenotype. (Figs. 5H vs. 5A).

SSEA-1 and contractile proteins expression in P19 cells induced by OT and L-NAME. Beatings scores, gene expression of cardiac markers and GFP fluorescence independently pointed to a certain capacity of NO antagonists to induce cardiomyogenesis. However, this capacity seemed lower when evaluated by beating scores than by the two other criteria. We therefore analyzed the extent of cardiomyogenic development by fluorescence immunocytochemistry using a marker of the undifferentiated state, the SSEA-1 surface antigen [20], and two markers of the CM contractile apparatus, sarcomeric myosin heavy chain (MHC) and dihydropyridine receptor (DHPR) [7]. The original P19 cell strain was used in these experiments to avoid GFP fluorescence interference. Positive staining with monoclonal antibody against SSEA-1 indicated a lack of differentiation in non-induced cells (Fig. 4.7L). A smaller fraction of cells positive for SSEA-1 after induction by OT and/or L-NAME (Figs. 7I-7K) indicated that a differentiation process occurred in these cultures. As expected, non-induced cells were not positive for DHPR and MHC (Figs. 7D, H). The two contractile proteins produced clearly visible signals in OT-treated cultures (Figs. 7A, E) while they were almost undetectable in cells induced with OT+L-NAME and L-NAME (Figs. 7B, F, C, G). Therefore, in contrast to OT, L-NAME-based treatments did not allow differentiation into developed CM. It is possible that, in addition to CM, some cells in OT- and/or L-NAME-treated cultures differentiated to other, noncardiac cell phenotypes.

P19 cell proliferation in the presence of DMSO, OT and NO modulators. Cell density was shown to have an influence on P19 cell differentiation to neuronal lineages [30,31] and this could also apply to cardiac differentiation. We compared the proliferative effect of DMSO, OT and NO modulators endowed with different cardiomyogenic efficiencies. These studies were done with P19 cells grown in monolayers for simplicity. Fig. 4.8 shows that many treatments, including treatments with OT, DMSO and L-NAME, had a proliferative action. DMSO and L-NAME were the most potent proliferation inducers, causing a doubling of the cell populations. Proliferation in cultures treated with the NO antagonists ODC and 1400W was similar to that of non-induced cultures. In contrast to the other agents, the NO donor

SNAP decreased proliferation by 60% as compared to non-induced cultures. The antiproliferative effect of SNAP on P19 cells grown in aggregates was however less pronounced than on monolayers, the decrease being of 25% (data not shown). This finding would indicate a less invading influence of SNAP in three-dimensional, closely packed cell cultures.

4.7. Discussion

This report follows up studies on the mechanism of OT-induced stem cell differentiation into CM. In previous investigations, we have provided evidence that during differentiation of P19 EC cells, expression of the OT receptor is enhanced. OT acting via the OT receptor could stimulate NO as observed in other physiological situations [11-16]. Here, we demonstrated that, indeed, NO is involved in OT-induced CM differentiation. We found that inhibition of NOS pathways reduces the generation of functional, contracting CM, indicating that the OT-mediated pathway of CM differentiation includes NO as a transducing molecule in the cascade of intracellular events. This was further supported by reversal of the L-NAME effect with the NO donor SNAP.

NO is an ubiquitous signaling molecule, characterized by high reactivity but with a self-limiting duration of action. NO acts through cGMP-dependent and cGMP-independent pathways to regulate gene expression by modulating transcription factors, translation or the stability of mRNA and proteins [32-34]. These features of NO are thus compatible with its differentiation potential. The importance of NO signaling in cardiomyogenesis was demonstrated with murine ES cells. These cells spontaneously differentiate into CM upon removal of LIF followed by cell aggregation. Like embryonic cardiac cells, cultured ES cells express iNOS, eNOS and sGC during their differentiation program [17,35]. Incubation of these cells with NOS and sGC inhibitors after the aggregation period resulted in a pronounced differentiation arrest of CM as revealed by immature cross striation patterns, and this arrest by NO antagonists was reversed by co-application of a NO donor [17]. The

treatment of ES cells with SNAP or their transduction with iNOS gene, both carried out after aggregation, increased the number of spontaneously contracting cell clusters and the expression level of cardiac MLC protein, and these effects were decreased by L-NAME as well as the iNOS inhibitor L-NIL [18]. Altogether, these results point to an important role of NO in CM maturation. The present work shows that NO has also a role in cell determination towards a CM phenotype. Addition of SNAP (at the concentration used by Kanno et al. [18]) into the culture medium of P19Cl6-GFP cells, during aggregation, induced beating cell colonies and GFP cardiac reporter fluorescence. NO also clearly mediates the cardiomyogenic determination of P19 cell lines induced by OT. The functional involvement of iNOS/eNOS/sGC in OT action was demonstrated by the antagonistic effect of inhibitors of these NO pathways and by OT stimulation of eNOS mRNA (a stimulation inhibited by L-NAME). Inducible NOS transcript was undetected in our conditions (data not shown). OT was shown to upregulate NO in endothelial cells [11] and iNOS in fetal membranes [36] and, recently, we obtained evidence of correlated changes of OT receptor and eNOS and iNOS expression in the heart during rat pregnancy [37]. OT has also a role in CM maturation of P19 cells since co-application of L-NAME with OT drastically reduced beatings scores and contractile protein expression whereas there was relatively less pronounced reduction of GATA4 and ANP transcripts. Interestingly, OT exhibited a more efficient cardiomyogenic action than SNAP as assessed by the number of beating cultures, the size of contractile colonies and the GFP fluorescence. This could be due to a fine regulation of NO levels by OT as compared to SNAP and/or the contribution of additional, NO-independent, transduction pathways triggered by OT. It is noteworthy that L-NAME also inhibited DMSO-induced differentiation to beating CM, a finding consistent with the notion that DMSO cardiomyogenesis is mediated through the OT system [7].

Endogenous OT, acting in paracrine and autocrine ways, could be implicated in CM differentiation. In accordance with this hypothesis, our experiments indeed showed that OT gene expression in P19 cells was enhanced after OT induction and lowered in the presence of L-NAME. OT RIA in P19 cells revealed that although

most of the peptide was targeted for secretion, consistent amounts of OT were also found in cells, raising the additional possibility of an “intracrine” action of the hormone in cells co-expressing OT and its receptor. Upregulation of OT occurring early in induced cells (day 6) could provide a means to sustain NO production (for example, through eNOS upregulation) even after removal of the exogenously provided hormone. In addition, the stimulatory effect of OT on P19 cell proliferation could finely tune NO-mediated action on cell proliferation/differentiation. This would be important given dual roles of NO in various situations. For example, in neurogenesis, proliferation must cease for differentiation to occur but a precocious arrest of proliferation by NO diminishes the number of neurally differentiated cells [38,39]. NO was found to inhibit ischemia/reperfusion-induced apoptosis in CM whereas overexposure to NO donors augmented the incidence of apoptosis in these cells [40,41]. Interestingly, eNOS deficiency during cardiac development was found associated with increased apoptosis of cardiomyocytes [42]. It was reported that OT receptor localization in lipid rafts enriched in caveolin-1 turns the inhibition of cell growth into a proliferative response [43], and OT receptors localized to cell caveolae are coupled to eNOS. Thus in considering the opposite effect of OT and SNAP on P19 cell proliferation, a requirement for a timely controlled balance of proliferative and anti-proliferative influences could explain the different cardiomyogenic efficiency of OT and SNAP in this cellular model.

It has been shown that in DMSO-induced P19 cells, the expression of GATA4 transcript and protein is restricted to cells committed to the cardiac lineage, and GATA4 induction precedes the expression of cardiac marker genes as well as the appearance of beating cells [44]. GATA4 transcript was lower and delayed in samples treated with OT+L-NAME compared to OT alone. These observations indicate that L-NAME treatment modulates GATA4 expression and possibly functions at early stages of CM differentiation. The detailed mechanisms are still to be defined but a study showed that NO can modulate GATA4 function through post-translational modifications [34]. GATA4 expression was reduced but not knocked down when L-NAME was administered together with OT. However the deficit of GATA4 can severely impair the cardiomyogenic program by limiting combinatorial

interactions with other cardiac transcription factors, such as MEF2 and Nkx2.5. These interactions, often displaying synergistic modulation of target gene expression, are necessary for achievement of CM differentiation [45-47]. Gene expression of ANP [48], MHC [49-51] and DHPR [52,53] is controlled in part by GATA4, MEF2 and/or Nkx2.5 responsive elements.

Finally, unexpectedly, we found that L-NAME alone as well as 1400W and ODQ stimulate early cardiomyogenesis in P19 cells. Even the combination of the two NOS inhibitors L-NAME and 1400W showed cardiomyogenic action (data not shown). L-NAME downregulated the embryonic cell marker SSEA-1, and stimulated GATA4 and ANP transcripts and GFP reporter gene. L-NAME, however, induced only a few small round clusters of weakly-beating cell colonies and inhibited the synthesis of MHC and DHPR markers displayed in terminally-differentiated CM. These findings suggest that the decrease of NO by L-NAME can remove a repressive barrier on differentiation, and/or provide an inductive clue to initiate cardiomyogenesis but insufficient to complete CM differentiation and maturation. One interesting observation in line with this proposal is that LIF, which presence is required to maintain ES cells in their undifferentiated cells, was shown to upregulate iNOS in trophoblasts and smooth muscle cells [54,55]. It is not known whether LIF activates NO pathways in ES cells but, if this holds true, then the desactivation of these pathways upon LIF removal could be equivalent to the treatment of P19 EC cells with NO antagonists, leading cells to engage into differentiation program(s). A biphasic, concentration-dependent role of NO has been observed in various situations, including in developmental contexts [56,57]. With this consideration in mind, we tested whether serial application of OT and L-NAME could better induce P19 cell cardiomyogenesis than OT but the results were negative. Aggregates exposed for two days with L-NAME followed by OT treatment for the next two days generated beating colonies in 7 wells at day 14 compared to 24 wells with 4 days of OT administration, and treatment done in the inverse order induced beating colonies in 12 wells (data not shown). The tuning of potentially-positive and negative NO actions and the molecular recognition of these balances will be central to

understanding the role of NO throughout the whole CM differentiation process (pre-commitment, determination, maturation).

In summary, we found that inhibition of NO signaling reduces OT-mediated differentiation of mouse P19 cells into CM. The detailed mechanisms of OT and NO relationships in cardiomyogenesis are not known but it is showed that OT upregulates eNOS expression during this process. The treatment with NO, generated from SNAP, does not enhance CM differentiation induced by OT. Moreover, beating colonies are larger in OT- than in SNAP-induced cells. This suggests that additional signaling pathway(s) besides NO are involved in OT-stimulated cardiomyogenesis. Because L-NAME, in addition, initiates CM differentiation, we postulate that NO influences cardiac differentiation in P19 cells through positive and negative mechanisms.

ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge the editorial work of Mr. Ovid Da Silva, the helpful advice of Dr. Donghao Wang in the PCR studies, and the secretarial assistance of Mrs. Antoinette Paolitto. B.A.D. is the recipient of a studentship from Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies (FQRNT) and a studentship from Université du Québec à Montréal. This work was supported by Canadian Institutes of Health Research and Canadian Heart and Stroke Foundation grants MOP-53217 (to J.G. and M.J.), and NET SRD-63193 (to J.G., M.J., and J.P. as well as to Drs G. Blaise from CHUM-Notre-Dame, Montreal, Que., and E. Troncy, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Que.).

4.8. References

- [1]. Wobus AM, Boheler KR. (2005) Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol Rev*; **85**: 635-678.
- [2]. van der Heyden MA, Defize LH. (2003) Twenty one years of P19 cells: what an embryonal carcinoma cell line taught us about cardiomyocyte differentiation. *Cardiovasc Res*; **58**:292-302.
- [3]. van der Heyden MA, van Kempen MJ, Tsuji Y, Rook MB, Jongsma HJ, Opthof T. (2003) P19 embryonal carcinoma cells: a suitable model system for cardiac electrophysiological differentiation at the molecular and functional level. *Cardiovasc Res*; **58**:410-422.
- [4]. Moore JC, Spijker R, Martens AC, de Boer T, Rook MB, van der Heyden MA, Tertoolen LG, Mummery CL. (2004) A P19Cl6 GFP reporter line to quantify cardiomyocyte differentiation of stem cells. *Int J Dev Biol*; **48**:47-55.
- [5]. Gutkowska J, Jankowski M, Lambert C, Mukaddam-Daher S, Zingg HH, McCann SM. (1997) Oxytocin releases atrial natriuretic peptide by combining with oxytocin receptors in the heart. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **94**:11704-11709.
- [6]. Jankowski M, Hajjar F, Kawas SA, Mukaddam-Daher S, Hoffman G, McCann SM, Gutkowska J. (1998) Rat heart: a site of oxytocin production and action. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **95**:14558-14563.
- [7]. Paquin J, Danalache BA, Jankowski M, McCann SM, Gutkowska J. (2002) Oxytocin induces differentiation of P19 embryonic stem cells to cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **99**:9550-9555.
- [8]. Jankowski M, Danalache B, Wang D, Bhat P, Hajjar F, Marcinkiewicz M, Paquin J, McCann SM, Gutkowska J. (2004) Oxytocin in cardiac ontogeny. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **101**:13074-13079.
- [9]. Matsuura K, Nagai T, Nishigaki N, Oyama T, Nishi J, Wada H, Sano M, Toko H, Akazawa H, Sato T, Nakaya H, Kasanuki H, Komuro I. (2004) Adult cardiac Sca-1-positive cells differentiate into beating cardiomyocytes. *J Biol Chem*; **279**:11384-11391.
- [10]. Gimpl G, Fahrenholz F. (2001) The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev*; **81**:629-683.

- [11]. Thibonnier M, Conarty DM, Preston JA, Plesnicher CL, Dweik RA, Erzurum SC. (1999) Human vascular endothelial cells express oxytocin receptors. *Endocrinology*; **140**:1301-1309.
- [12]. Haraldsen L, Soderstrom-Lauritzen V, Nilsson GE. (2002) Oxytocin stimulates cerebral blood flow in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) through a nitric oxide dependent mechanism. *Brain Res.*; **929**(1):10-4.
- [13]. Chiodera P, Volpi R, Manfredi G, Bortesi ML, Capretti L, Magotti MG, Saccanijotti G, Coiro V. (2003) Effect of oxytocin on nitric oxide activity controlling gonadotropin secretion in humans. *Eur J Clin Invest.*; **33**(5):402-5.
- [14]. Selvage DJ, Johnston CA. (2004) Interaction between norepinephrine, oxytocin, and nitric oxide in the stimulation of gonadotropin-releasing hormone release from proestrous rat basal hypothalamus explants. *J Neuroendocrinol.*; **16**(10):819-24.
- [15]. Mukaddam-Daher S, Yin YL, Roy J, Gutkowska J, Cardinal R. (2001) Negative inotropic and chronotropic effects of oxytocin. *Hypertension.*; **38**(2):292-296.
- [16]. Petersson M. (2002) Cardiovascular effects of oxytocin. *Prog Brain Res.*; **139**:281-8.
- [17]. Bloch W, Fleischmann BK, Lorke DE, Andressen C, Hops B, Hescheler J, Addicks K. (1999) Nitric oxide synthase expression and role during cardiomyogenesis. *Cardiovasc Res*; **43**:675-684.
- [18]. Kanno S, Kim PK, Sallam K, Lei J, Billiar TR, Shears LL. (2004) Nitric oxide facilitates cardiomyogenesis in mouse embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **101**:12277-12281.
- [19]. Laplante I, Paquin J, Beliveau R. (2001) RhoB expression is induced after the transient upregulation of RhoA and Cdc42 during neuronal differentiation and influenced by culture substratum and microtubule integrity. *Dev Brain Res*; **129**:157-168.
- [20]. Jeannotte R, Paquin J, Petit-Turcotte C, Day R. (1997) Convertase PC2 and the neuroendocrine polypeptide 7B2 are co-induced and processed during neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *DNA Cell Biol*; **16**:1175-1187.
- [21]. Nemer G, Nemer M. (2003) Transcriptional activation of BMP-4 and regulation of mammalian organogenesis by GATA4 and -6. *Dev Biol*; **254**:131-148.
- [22]. Lefebvre DL, Giaid A, Bennett H, Lariviere R, Zingg HH. (1992) Oxytocin gene expression in rat uterus. *Science*; **256**:1553-1555.

- [23]. Laplante I, Béliveau R, Paquin, J. (2004) RhoA/ROCK and Cdc42 regulate cell-cell contact and N-cadherin protein level during neurodetermination of P19 embryonal stem cells. *J Neurobiol*, **60**:289-307.
- [24]. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*; **43**:109-142.
- [25]. Chlopicki S, Olszanecki R, Jakubowski A, Lomnicka M, Gryglewski RJ. (1999) L-N6-(1-iminoethyl)-lysine (L-NIL) but not S-methylisothiourea sulphate (SMT) displays selectivity towards NOS-2. *Pol J Pharmacol.*; **51**(5):443-7.
- [26]. Boheler KR, Czyz J, Tweedie D, Yang HT, Anisimov SV, Wobus AM. (2002) Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Circ Res.*; **91**(3):189-201.
- [27]. Habara-Ohkubo A. (1996) Differentiation of beating cardiac muscle cells from a derivative of P19 embryonal carcinoma cells. *Cell Struct Funct*, **21**:101-110.
- [28]. Garvey EP, Oplinger JA, Furfine ES, Kiff RJ, Laszlo F, Whittle BJ, Knowles RG. (1997) 1400W is a slow, tight binding, and highly selective inhibitor of inducible nitric-oxide synthase in vitro and in vivo. *J Biol Chem.*; **272**(8):4959-63.
- [29]. Garthwaite J, Southam E, Boulton CL, Nielsen EB, Schmidt K, Mayer B. (1995) Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. *Mol Pharmacol.*; **48**(2):184-8.
- [30]. Berg RW, McBurney MW. (1990) Cell density and cell cycle effects on retinoic acid-induced embryonal carcinoma cell differentiation. *Dev Biol.*; **138**(1):123-35.
- [31]. Kitani H, Ikeda H, Atsumi T, Watanabe R. (1997) Efficiency of neural differentiation of mouse P19 embryonal carcinoma cells is dependent on the seeding density. *Cell Transplant.*; **6**(5):521-5.
- [32]. Bogdan C. (2001) Nitric oxide and the regulation of gene expression. *Trends Cell Biol*; **11**:66-75.
- [33]. Braam B, de Roos R, Dijk A, Boer P, Post JA, Kemmeren PP, Holstege FC, Bluysen HA, Koomans HA.. (2004) Nitric oxide donor induces temporal and dose-dependent reduction of gene expression in human endothelial cells. *Am J Physiol*; **287**:H1977-H1986.

- [34]. Suzuki YJ, Nagase H, Day RM, Das DK. (2004) GATA4 regulation of myocardial survival in the preconditioned heart. *J Mol Cell Cardiol*; **37**:1195-203.
- [35]. Bloch W, Addicks K, Hescheler J, Fleischmann BK. (2001) Nitric oxide synthase expression and function in embryonic and adult cardiomyocytes. *Microsc Res Tech*; **55**(4):259-69.
- [36]. Ticconi C, Zicari A, Realacci M, Di Vito M, Denora P, Narcisi M, Russo MA, Piccione E. (2004) Oxytocin modulates nitric oxide generation by human fetal membranes at term pregnancy. *Am J Reprod Immunol*; **52**(3):185-91
- [37]. Jankowski M, Wang D, Mukaddam-Daher S, Gutkowska J. (2005) Pregnancy alters nitric oxide synthase and natriuretic peptide systems in the rat left ventricle. *J Endocrinol*; **184**:209-217.
- [38]. Contestabile A, Ciani E. (2004) Role of nitric oxide in the regulation of neuronal proliferation, survival and differentiation. *Neurochem Int* ; **45**(6):903-14.
- [39]. Matarredona ER, Murillo-Carretero M, Moreno-Lopez B, Estrada C. (2004) Nitric oxide synthesis inhibition increases proliferation of neural precursors isolated from the postnatal mouse subventricular zone. *Brain Res*; **995**(2):274-84.
- [40]. Maejima Y, Adachi S, Ito H, Nobori K, Tamamori-Adachi M and Isobe M. (2003) Nitric oxide inhibits ischemia/reperfusion-induced myocardial apoptosis by modulating cyclin A-associated kinase activity. *Cardiovasc Res*; **59**:308-320.
- [41]. Uchiyama T, Otani H, Okada T, Ninomiya H, Kido M, Imamura H, Nogi S, Kobayashi Y. (2002) Nitric oxide induces caspase-dependent apoptosis and necrosis in neonatal rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*; **34**:1049-1061.
- [42]. Feng Q, Song W, Lu X, Hamilton JA, Lei M, Peng T, Yee SP. (2002) Development of heart failure and congenital septal defects in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*; **106**(7):873-9.
- [43]. Cassoni P, Sapino A, Marrocco T, Chini B, Bussolati G. (2004) Oxytocin and oxytocin receptors in cancer cells and proliferation. *J Neuroendocrinol*; **16**:362-364.
- [44]. Grépin C, Robitaille L, Antakly T, Nemer M. (1995) Inhibition of transcription factor GATA4 expression blocks in vitro cardiac muscle differentiation. *Mol Cell Biol*; **15**:4095-4102.
- [45]. Durocher D, Nemer M. (1998) Combinatorial interactions regulating cardiac transcription. *Dev Genet*, **22**:250-262.

- [46]. Lien CL, Wu C, Mercer B, Webb R, Richardson JA, Olson EN. (1999) Control of early cardiac-specific transcription of *Nkx2-5* by a GATA-dependent enhancer. *Development*.; **126**(1):75-84.
- [47]. Pikkarainen S, Tokola H, Kerkela R, Ruskoaho H. (2004) GATA transcription factors in the developing and adult heart. *Cardiovasc Res*; **63**:196-207.
- [48]. Temsah R, Nemer M. (2005) GATA factors and transcriptional regulation of cardiac natriuretic peptide genes. *Regul Pept.*; **128**(3):177-85.
- [49]. Weiss A, Leinwand LA. (1996) The mammalian myosin heavy chain gene family. *Annu Rev Cell Dev Biol.*; **12**:417-39.
- [50]. Morkin E. (2000) Control of cardiac myosin heavy chain gene expression. *Microsc Res Tech.*; **50**(6):522-31.
- [51]. Liu H, Harris TM, Kim HH, Childs G. (2005) Cardiac myocyte differentiation: the *Nkx2.5* and *Cripto* target genes in P19 clone 6 cells. *Funct Integr Genomics.*; **5**(4):218-39.
- [52]. Zheng Z, Wang ZM, Delbono O. (2002) Charge movement and transcription regulation of L-type calcium channel $\alpha(1S)$ in skeletal muscle cells. *J Physiol.* **15**;540(Pt 2):397-409. Erratum in: *J Physiol* (2002) **15**;541(Pt 3):1059.
- [53]. Liu L, Fan QI, El-Zaru MR, Vanderpool K, Hines RN, Marsh JD. (2000) Regulation of DHP receptor expression by elements in the 5'-flanking sequence. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*; **278**(4):H1153-62.
- [54]. Moran CS, Campbell JH, Campbell GR. (1997) Induction of smooth muscle cell nitric oxide synthase by human leukaemia inhibitory factor: effects in vitro and in vivo. *J Vasc Res.*, **34**:378-85.
- [55]. Hambartsoumian E, Srivastava RK, Seibel MM. (2001) Differential expression and regulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNA in human trophoblasts in vitro. *Am J Reprod Immunol.*, **45**:78-85.
- [56]. Bu S, Xia G, Tao Y, Lei L, Zhou B. (2003) Dual effects of nitric oxide on meiotic maturation of mouse cumulus cell-enclosed oocytes in vitro. *Mol Cell Endocrinol.*; **207**(1-2):21-30.
- [57]. Thaler CD, Epel D. (2003) Nitric oxide in oocyte maturation, ovulation, fertilization, cleavage and implantation: a little dab'll do ya. *Curr Pharm Des.*; **9**(5):399-409.

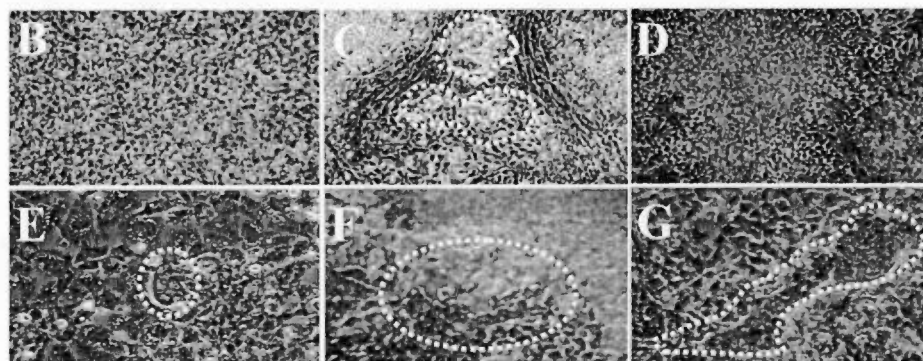
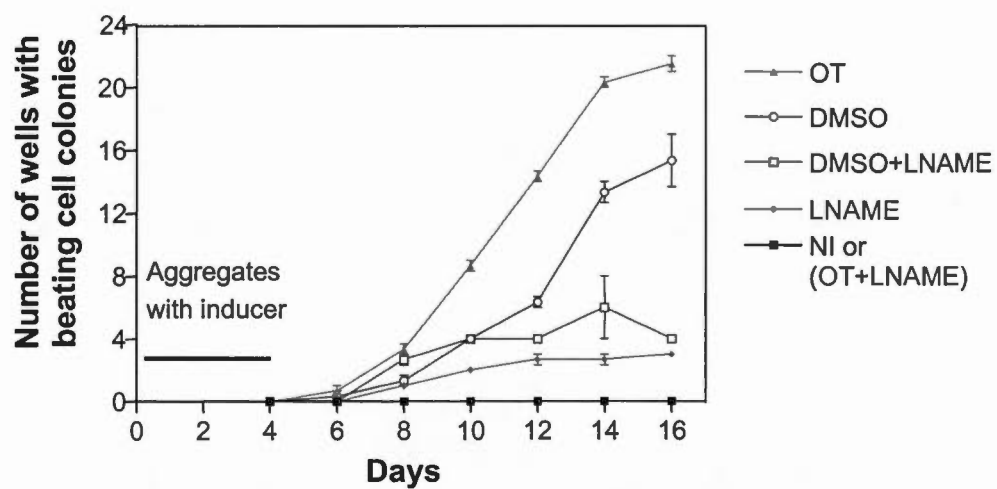
A**Figure 4.1.**

Figure 4.1. L-NAME inhibits OT- and DMSO-induced generation of beating cells. **(A)** Time course of appearance of beating cell colonies upon treatment with different agents. Cell aggregates non-induced (NI) or induced for 4 days with the indicated agent(s) were evenly distributed in wells of a 24-well tissue culture plate. Then each plate was examined at 2-day intervals for the number of wells containing beating cell colonies. The results (mean \pm SEM) are from 3 independent differentiation experiments. **(B-G)** Morphology of day 14 contracting cell colonies in non-induced condition (B), or following induction with (C) OT, (D) OT+L-NAME, (E) L-NAME, (F) DMSO, and (G) DMSO+L-NAME. Magnification: 100x (B-D), and 200x (E-G). Dotted lines encircle contracting cell colonies. Video-images of contracting cell colonies are available for E-G.

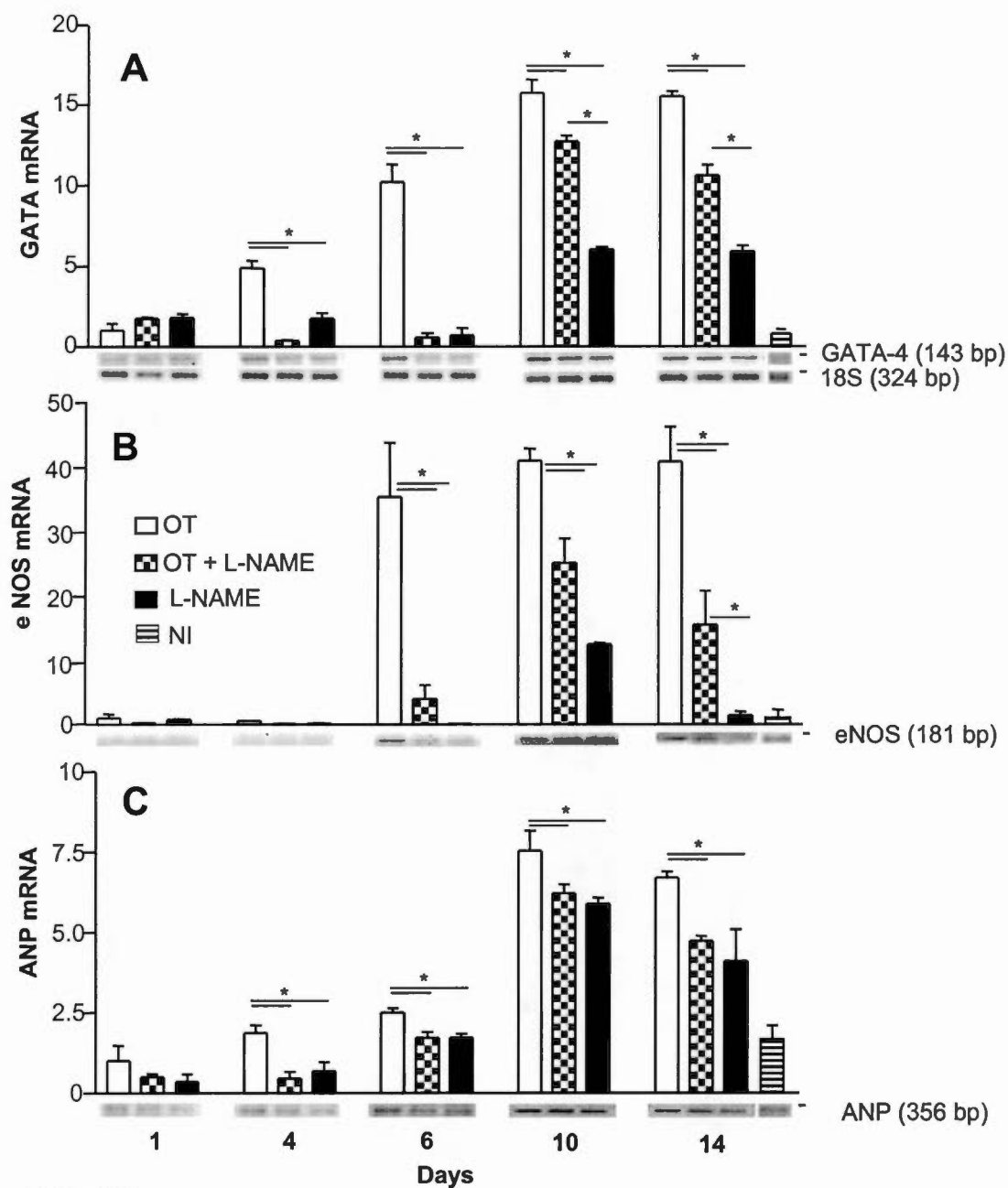


Fig. 4.2.

Figure 4.2. Time-course RT-PCR analysis of gene expression during cardiomyocyte differentiation of P19 cells induced by OT, OT+L-NAME or L-NAME alone. **(A)** GATA4 mRNA, **(B)** endothelial nitric oxide synthase (eNOS) mRNA, and **(C)** atrial natriuretic peptide (ANP) mRNA. The results (mean \pm SEM) are from 3 independent experiments performed in duplicate. * $P < 0.05$ are graphically represented to show differences between 3 treatments at a given day or for the given treatment at different days.

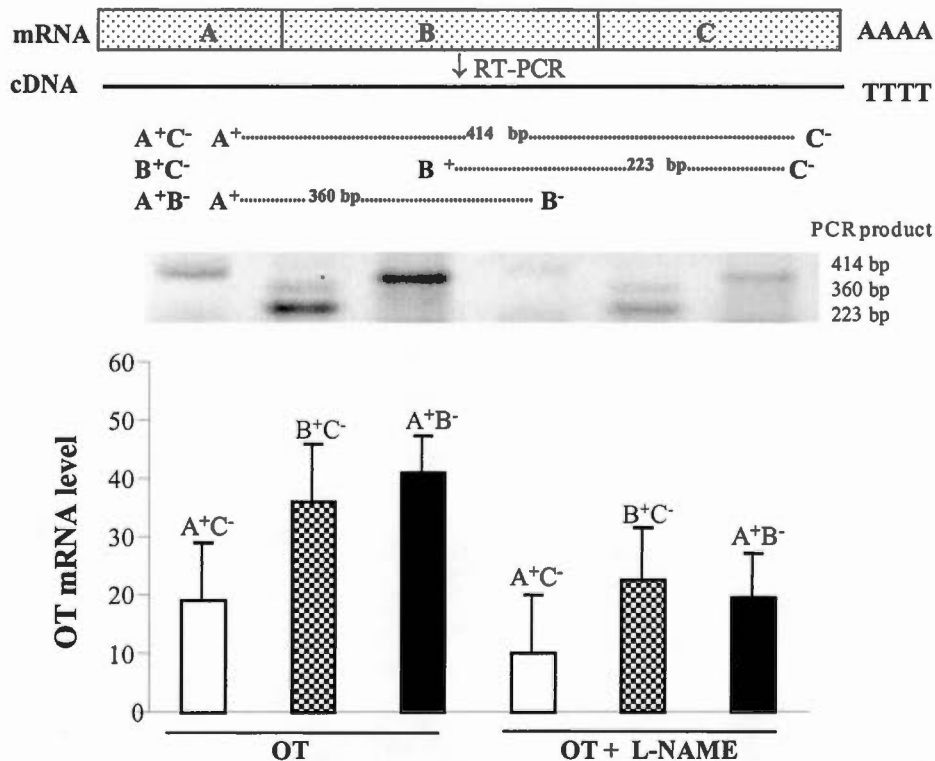


Figure 4.3. RT-PCR analysis of OT gene expression in OT-stimulated P19 cells. PCR amplification of products obtained with OT exon-specific primers using reverse-transcribed mRNA from P19 cells induced by OT and OT+L-NAME. A⁺C⁻- 223-bp OT cDNA products of PCR from primers located on exons 1 and 2; A⁺B⁻- 414-bp OT cDNA products of PCR from primers located on exons 1 and 3; B⁺C⁻- 360-bp OT cDNA products of PCR from primers located on exons 2 and 3. L-NAME decreases endogenous OT expression in OT-induced P19 cells collected at day 6 of the differentiation protocol. The results are representative of three independent cell series.

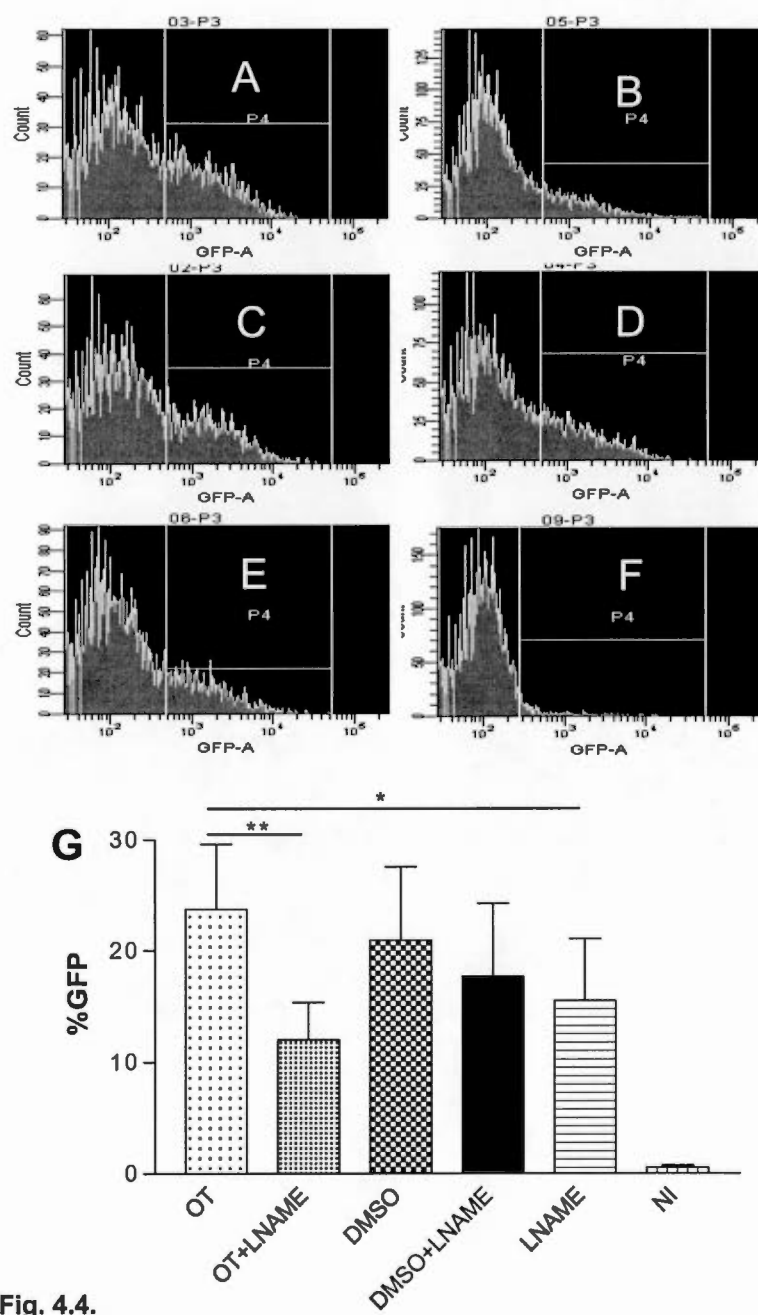
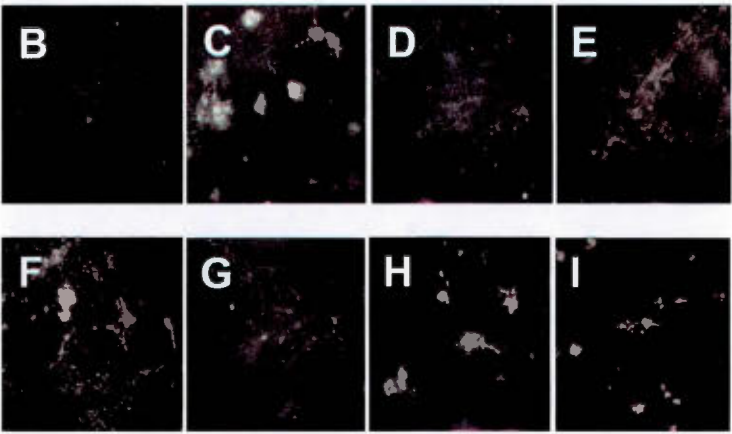
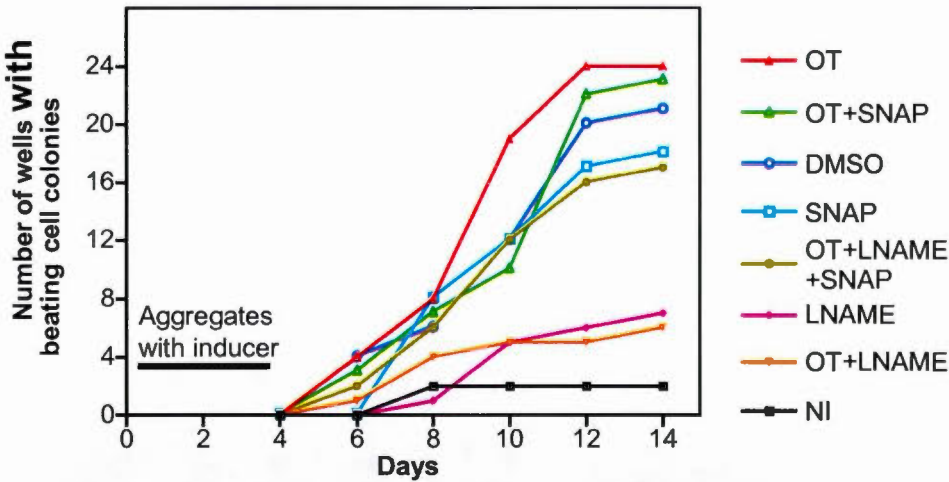


Fig. 4.4.

Figure 4.4. Representative flow cytometry analysis of green fluorescence emitting P19Cl6-GFP cells induced into cardiomyocyte differentiation by (A) OT, (B) OT+L-NAME, (C) DMSO, (D) DMSO+L-NAME, (E) L-NAME alone, and (F) non-induced control cells (NI). (G) The bars quantitatively illustrate results (mean \pm SEM) of 3 independent experiments performed at day 6, coupled with the appearance of the first contracting cell colonies in differentiated cultures. * $P < 0.05$ indicates the difference vs. culture induced with OT. NI was significantly different from all other treatments ($p < 0.05$); OT was significantly different from OT+L-NAME ($p < 0.05$, **); OT was significantly different from L-NAME but not from DMSO ($p < 0.10$, *); and DMSO was not significantly different from DMSO+L-NAME (using $p < 0.10$).

A



J

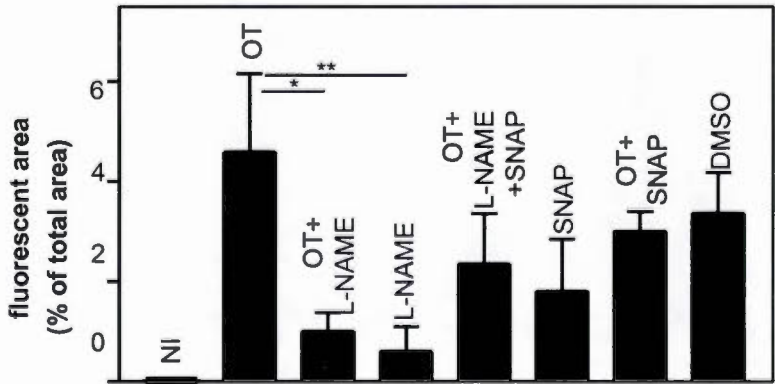


Fig. 4.5

Figure 4.5. SNAP reverses L-NAME inhibition on OT-induced cardiomyogenesis. **(A)** Time course of appearance of beating cell colonies in P19Cl6-GFP cells non-induced (NI) or induced with DMSO, OT, L-NAME, SNAP or their combinations. Induction treatment was done as described in the legend to Fig. 4.1. The results (mean \pm SEM) are from 3 independent cultures. **(B-I)** Representative GFP fluoromicrographs (day 10, magnification 100x) of (B) NI cultures, and cultures induced with (C) OT, (D) OT+L-NAME, (E) L-NAME, (F) OT+L-NAME+SNAP, (G) SNAP, (H) OT+SNAP, and (I) DMSO. **(J)** Calculated fluorescent areas (mean \pm SEM) from 3 representative fluoromicrographs for each treatment (one per culture). NI was significantly different from all other treatments ($p < 0.05$); OT was significantly different from L-NAME ($p < 0.05$, **) and OT+L-NAME ($p < 0.10$, *); and OT was not significantly different from OT+L-NAME+SNAP, SNAP, OT+SNAP and DMSO (using $p < 0.10$). The level of significance of $p < 0.10$ indicate tendency of change, taking into account the inherently large fluorescence variability existing between pictures.

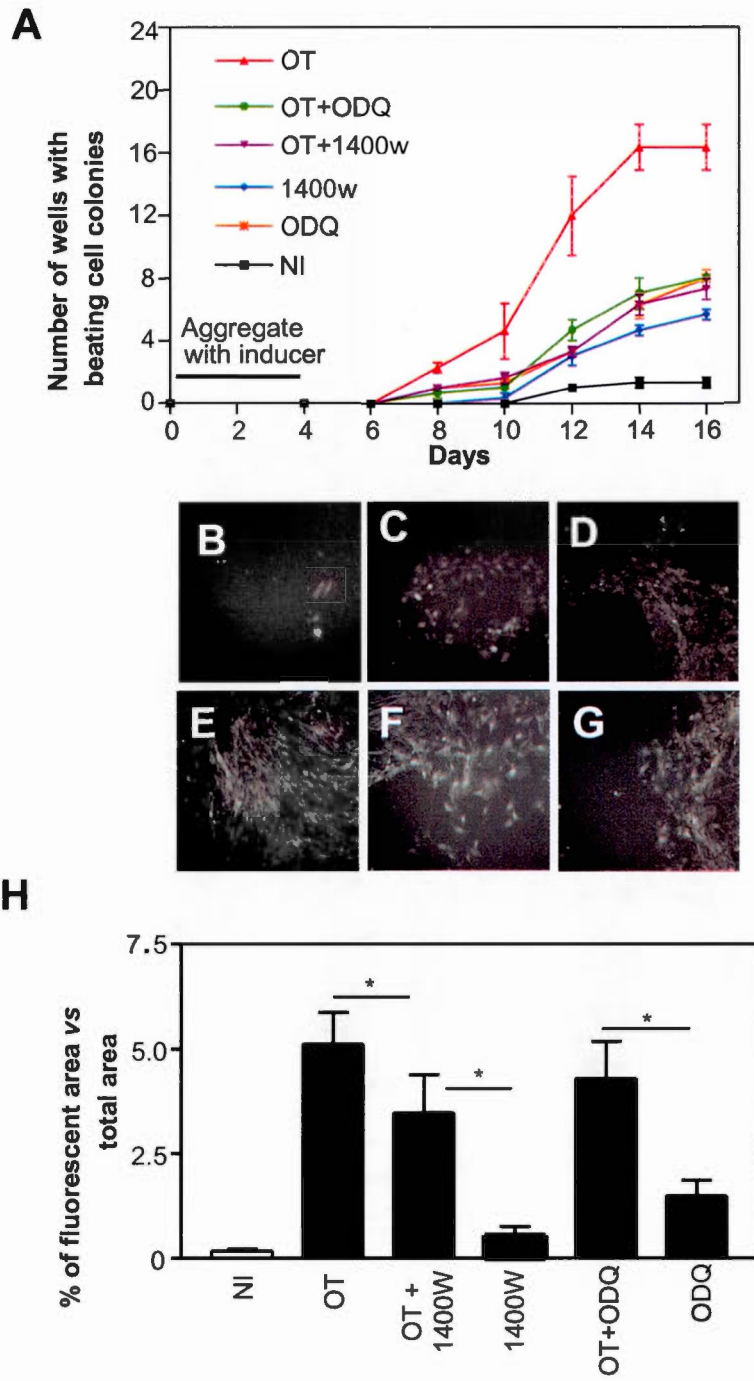


Figure 4.6.

Figure 4.6. Other inhibitors of NOS/sGC pathways reduce OT cardiomyogenic action. (A) Comparison of time-course generation of contracting cell colonies in P19Cl6-GFP cells non-induced (NI) or induced with OT, 1400W, ODQ or their combinations. Induction treatment was done as described in the legend to Fig. 4.1. The results (mean \pm SEM) are from 3 independent cultures. (B-G) Representative GFP fluoromicrographs (day 10, magnification 100x) of (B) NI cultures, and cultures induced with (C) 1400W, (D) ODQ, (E) OT, (F) OT+1400W, and (G) OT+ODQ. (H) Calculated fluorescent areas (mean \pm SEM) from 16 representative fluoromicrographs for each treatment (5-6 per culture). NI was significantly different from all other treatments ($p < 0.05$); OT was significantly different from OT+1400W but not from OT+ODQ ($p < 0.10$, *); OT+1400W was significantly different from 1400W ($p < 0.05$, **), and OT+ODQ was significantly different from ODQ ($p < 0.05$, **). The level of significance of $p < 0.10$ indicate tendency of change, taking into account the inherently large fluorescence variability existing between pictures.

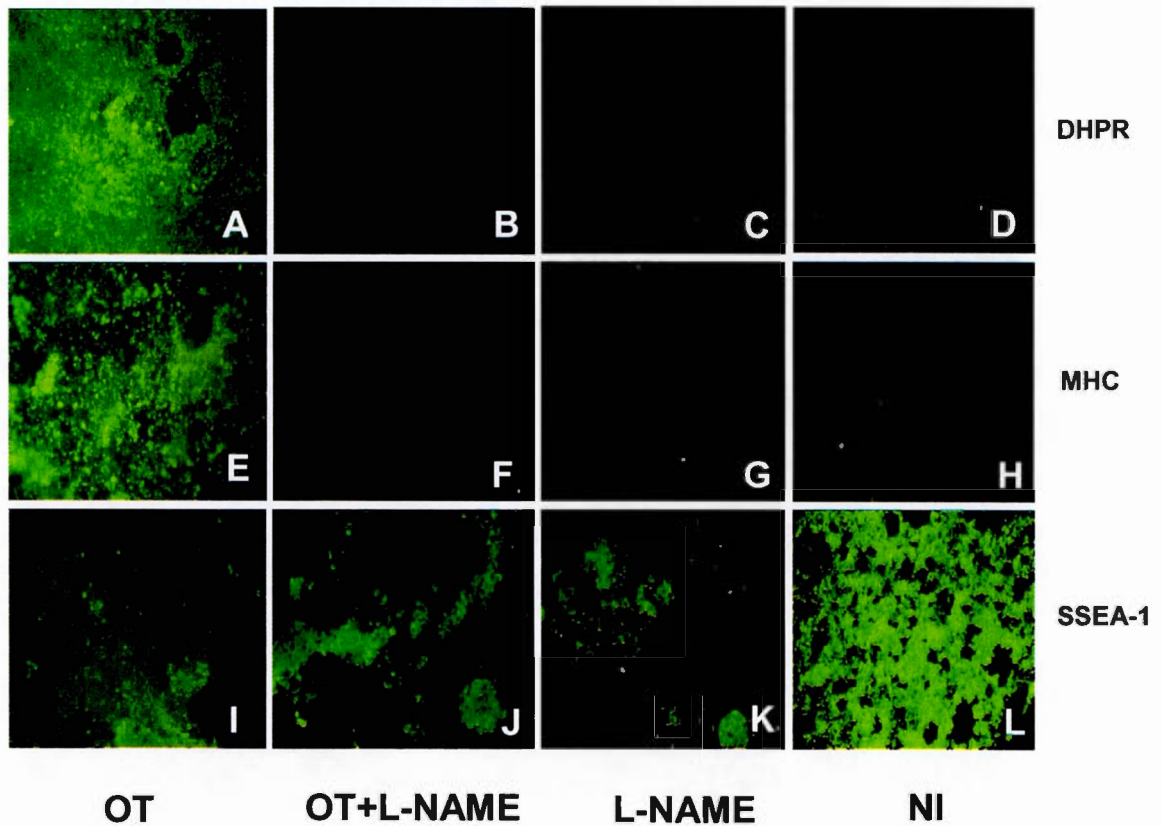


Figure 4.7. Staining of P19 cells for embryonic cell marker SSEA-1, sarcomeric myosin heavy chain (MHC) and dihydropyridine receptor (DHPR) at day 14 of cardiomyocyte differentiation. Cells aggregated for 4 days in 6 cm-diam bacteriological petris in the absence (NI) or presence of OT, OT+L-NAME and L-NAME were transferred into 10 cm-diam tissue culture dishes (one dish for each petri) and cultured until day 14. The entire dishes were subjected to immunocytochemistry and representative fields are shown (magnification 100x). MHC and DHPR signals were barely detectable in NI cultures and cultures induced with OT+L-NAME and L-NAME.

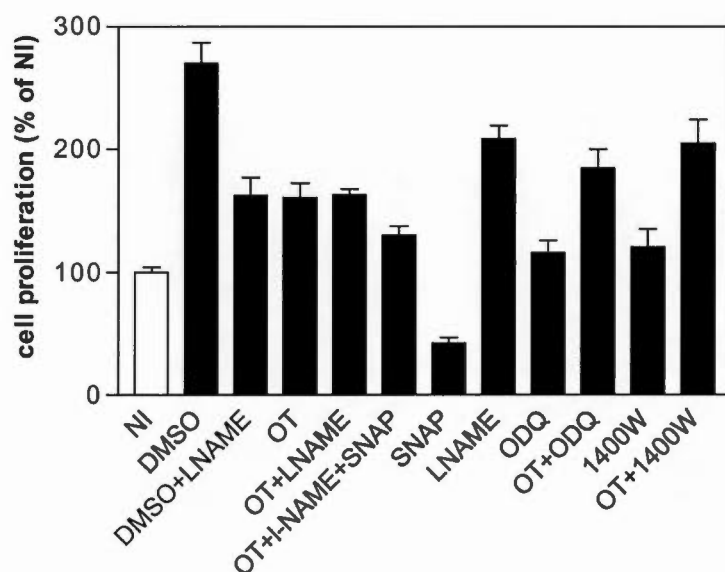


Figure 4.8. P19 cell proliferation. Cells were grown in tissue culture multiwell-plates for 48 h in the absence (NI) or presence of the indicated inducing agents, stained with crystal violet, and analysed spectrophotometrically at 595 nm. Results (means \pm SEM from quadruplicate determinations) are expressed relatively to NI cells. NI was significantly different ($p < 0.05$) from all treatments except from OT+L-NAME+SNAP, ODQ and 1400W.

TABLE 1. Primers and annealing conditions

NAME	SEQUENCE	CONDITIONS		
OTA+ sens	5'- GATCACCTACAGCGGATCTCAGAC-3'			
OTB+ sens	5'- TGCTTCGGACCAAGCATCTGC-3'			
OTB- anti-sens	5'- CCGGGCTGCAGCAGATGCCTGTGG-3'			
OTC- anti-sens	5'- GCGCTCCGAGAAGGCAGACTCAGGGTC-3'			
ANP sens	5'- CTGATGGATTTCAGAACCTGCTAGACC-3'			
ANP anti-sens	5'- CTGTTATCTTCGGTACCGAAGCTGTTGCAGCC-3'	1 min at 94°C	1 min at 53°C	1.3min at 72°C
eNOS sens	5'- AACCAGCGTCCTGCAAAAC-3'			
eNOS anti-sens	5'- CAAAGAAAAGCTCTGGGTGC-3'	1 min at 94°C	1min at 58°C	1.3min at 72°C
GATA4 sens	5'- CACTATGGGCACAGCAGCTCC-3'			
GATA4 anti-sens	5'- TTGGAGCTGGCCTGCGATGTC-3'	0.25 min at 94°C	0.3 min at 63°C	1min at 72°C
GADPH sens	5'- AAGGTCGGGTGTCAACCCATTGGCCGT-3'			
GADPH anti-sens	5'- CAGTGATGGCATCCACTGTGGTC-3'	1 min at 94°C	1.5 min at 59°C	2min at 72°C

Chapitre V

LES PEPTIDES OCYTOCINE-GLY-LYS-ARG, -GLY-LYS, ET -GLY SONT CARDIOMYOGÉNIQUES DANS LES CELLULES SOUCHES P19

5.1. Explication de la contribution

Ce chapitre présente sous forme d'une communication des résultats qui feront partie d'un article plus élaboré qui sera soumis plus tard. B. A. Danalache a contribué à l'élaboration et réalisé les expériences de différenciation cardiaque en présence de OT et OT-X (OT-Gly-Lys-Arg, OT-Gly-Lys et OT-Gly) sauf le passage sur le cytomètre de flux fait par un spécialiste. Il a contribué à la rédaction de cette communication.

5.2. Résumé

Le coeur est un site de synthèse et d'action de l'ocytocine (OT). L'abondance de OT dans le coeur de rat en développement et la capacité de OT d'induire la cardiomyogénèse de cellules souches embryonnaires P19 et de cellules souches cardiaques indiquent l'importance de OT dans la cardiomyogénèse. Dans les cellules, OT est produite sous forme de prohormone qui est séquentiellement clivée pour donner des peptides C-terminalement allongés (collectivement nommés OT-X: OT-Gly-Lys-Arg, OT-Gly-Lys et OT-Gly), et OT amidée, le produit final bioactif. Dans le cerveau de rat en développement, la conversion de OT-X en OT se produit plus complètement avec la maturation du fœtus. Cependant, il n'y a aucune information

sur les rôles physiologiques des OT-X et quelques études fonctionnelles ont montré que les OT-X ne sont pas des agonistes efficaces de OT. Nous ne savons pas si les OT-X s'accumulent à des niveaux détectables dans le cœur en développement mais considérant qu'ils sont des précurseurs obligatoires de OT, nous avons investigué si ces peptides sont impliqués dans la génération de cardiomyocytes. Les expériences ont été faites avec la lignée cellulaire rapporteur P19Clone6 qui exprime la protéine de fluorescence verte (GFP) sous le contrôle du promoteur de 250 pb de MLC-2v. Ces cellules permettent de suivre la génération de cardiomyocytes de type ventriculaire par fluorescence. La différenciation a été initiée par la formation de corps embryoides en gouttes pendantes et leur traitement pendant 4 jours avec un inducteur. OT (10^{-6} M), OT-X (10^{-6} M) et DMSO (0.5%) ont été utilisés comme inducteurs. Les cellules ont été cultivées du jour 4 au jour 14 dans des plats de culture tissulaire en absence d'inducteur. Tous les inducteurs ont généré des colonies de cellules battantes qui étaient fluorescentes. Les colonies battantes sont apparues plus vite en réponse à OT et OT-X (jour 6) qu'au DMSO (jour 7). L'analyse vidéo au jour 8 de trois champs microscopiques différents a révélé un nombre plus élevé de colonies contractiles dans les cultures induites avec OT-Gly-Lys-Arg comparativement à celles induites avec OT, OT-Gly, OT-Gly-Lys et DMSO ; la surface de culture occupée par des colonies contractiles était aussi la plus élevée avec OT-Gly-Lys-Arg. L'analyse FACS a montré que tous les inducteurs ont produit approximativement 5-15% de cellules GFP-positives au jour 5 et 55-58% au jour 14. Nos études révèlent pour la première fois la fonctionnalité des OT-X et leur action cardiomyogénique. Des traitements avec ces molécules pourraient promouvoir la cardiomyogénèse *in situ* et la régénération d'un cœur blessé.

The peptides oxytocin-Gly-Lys-Arg, -Gly-Lys and -Gly are cardiomyogenic in P19 stem cells

Key words: GFP recombinant P19Cl6 cells, myosin light chain-2v promoter, cardiac differentiation, FACS

Abbreviations: CM, cardiomyocytes; DMSO, dimethyl sulfoxide; EB, embryoid body; FACS, fluorescence activated cell sorting; GFP, green fluorescent protein; α MEM, α -modified Eagle's minimal essential medium; MLC-2v, myosin light chain-2ventricular; OT, oxytocin; OTR, oxytocin receptor; OT-X, C-terminally elongated forms of oxytocine; pro-OT, pro-oxytocin.

5.3. Abstract

Heart is a site of oxytocin (OT) synthesis and action. The OT abundance in early developing rat heart and OT capacity to generate cardiomyocytes from mouse P19 embryonic stem cells and adult cardiac stem cells indicate OT importance in cardiomyogenesis. In cells, OT is synthesized as a prohormone that is sequentially processed to C-terminally extended peptides (which are designated together as OT-X: OT-Gly-Lys-Arg, OT-Gly-Lys, OT-Gly), and amidated to give the final bioactive form. In the developing rat brain the processing of OT-X to OT occurs more completely as the fetus matures. However, there is no information on the physiological roles of OT-X and several functional studies showed that OT-X are not effective agonists at OT sensitive sites. It is not known if OT-X accumulate to detectable levels in the developing heart but, considering that they are obligatory precursors of OT, we investigated whether these peptides are involved in

cardiomyocyte generation. Experiments were performed in P19Clone6 reporter cell line expressing green fluorescence protein (GFP) under the control of the 250 bp MLC-2v promoter. In these cells cardiomyogenesis of the ventricular phenotype can be followed by fluorescence. The differentiation was initiated by formation of embryoid bodies in hanging drops exposed to the inducer for 4 days. Then cells were grown in tissue culture dishes until day 14. OT (10^{-6} M), OT-X (10^{-6} M) and DMSO (0.5%) were used as cardiomyocyte inducers. In response to inducers, the cultures produced contracting cell colonies that were fluorescent. The beating cell formation, indicating presence of functional cardiomyocytes, was observed earlier in the response to OT and OT-X (day 6) than DMSO (day 7). The videoanalysis at day 8 of 3 independent fields revealed significantly higher number of contracting cell colonies in samples induced by OT-Gly-Lys-Arg comparing to cells induced by OT, OT-Gly, OT-Gly-Lys and DMSO; the culture surface occupied by contractile colonies was also the largest with OT-Gly-Lys-Arg. FACS analysis demonstrated that all inducers produced about 5-15% GFP-positive cells at day 5 and 55-58% at day 14. Our studies revealed for the first time the functionality of OT-X and their cardiomyogenic potential. Treatment with these molecules can trigger cardiomyogenesis in situ and regenerate injured heart.

5.4. Introduction

For more than 50 years, OT was established and considered as a pregnancy hormone, since it increases contractions of the uterus smooth muscle necessary for cervical dilation prior to birth as well as causes contractions in the mammary gland to elicit the milk ejection in response to suckling (Gimpl and Fahrenholz, 2001). Recent studies however showed that OT is not necessary for the uterine contraction during birth and has far-reaching effects on both sexes in humans and animals. OT is a modulator of maternal, sexual and social behaviors such as caretaking, feeding, cleaning newly born pups. OT facilitates pair bonding between people and in the animal world between mothers and pups. Furthermore, OT is associated with reproduction in both sexes. OT has pain killing properties, mildly sedative effects, decreases blood pressure and is considered as an anti-stress hormone (Gimpl and Fahrenholz, 2001). OT is synthesized in the parvocellular neurons of the paraventricular (PVN) and supraoptic (SON) nuclei projecting throughout the brain. The OT-producing neurons also project to the pituitary where OT is stored and released into the bloodstream.

We have recently demonstrated that OT is involved in mediating cardiovascular functions and heart development. OT and its receptor (OTR) were shown in the mammalian heart and vasculature, where it is detected in fetal life, increased during development, and reaches the adult level at weaning (Jankowski et al, 2004; Gutkowska et al 1997). In addition OT induced cardiomyogenic differentiation of P19 embryonic carcinoma cells, a largely used model of undifferentiated embryonic stem cells (Paquin, Danalache et al, 2002).

The biosynthesis of OT was studied in different systems. The OT prohormone (pro-OT) is composed of the OT sequence, separated from the OT-associated neurophysine I sequence by the three amino acid spacer Gly-Lys-Arg (Altstein et al, 1988) (Fig.5.1). Biochemical and recombinant DNA studies demonstrated that OT is synthesized as a non-glycosylated precursor of molecular weight 15-16 kDa (Gainer et al, 1983). This precursor undergoes endoproteolytic cleavage by a convertase,

trimming of the C-terminal Lys and Arg by a carboxypeptidase B-like enzyme, and amidation of the terminating Gly (Fig.5.1) The resulting biologically active C-amidated nonapeptide is found in the systemic circulation.

The Gainer's group has clarified the structural forms of the prohormone processing intermediates in brain (Altstein et Gainer, 1988; Altstein et al, 1988). Interestingly, in the developing brain, pro-OT has been detected at embryonic day E17 and in the cleaved 12 amino acid form (OT-Gly-Lys-Arg) at E18. The existence of this stable OT-Gly-Lys-Arg intermediate form indicated proteolytic cleavage occurring at the C-terminus of the tripeptide spacer. The 11- and 10-residue species were not detected, potentially due to short life. The physiological role of these elongated forms (referred to as OT-X throughout) is not yet well understood. However, Mitchell et al (1998a, b) have shown the presence of these forms in the uterine tissue. Moreover, the concentration of the extended forms in uterine tissue was 5-30 times higher than OT and both increased progressively during the gestation. Similarly, in the sheep, plasma concentration of OT-X early in development is about 35.7 ± 9.8 pg/ml, higher than OT 14.3 ± 5.7 pg/ml (Morris et al, 1992). Similar pattern was found in human umbilical cord plasma (Mueller-Heubach et al, 1995). It has been shown that OT-X had an effect on uterine contractions; however, this effect was weaker than OT. The preliminary data (not published) shows that forms are present at detectable levels in the developing heart. They are obligatory precursors of OT in this organ since OT is produced in the heart. We therefore sought to determine whether the three OT-X are cardiomyogenic like OT itself. For this purpose we used the transgenic P19Clone6 cells expressing the green fluorescent protein (GFP) under the transcriptional control of the rat myosin light chain-2v (MLC-2v) promoter (Moore et al, 2004). This cell line (GFP-P19Cl6) allows to follow differentiation to cardiomyocytes (CM) of the ventricular phenotype in a variety of inducing conditions (Moore et al, 2004). We have already observed GFP-positive clusters of beating cells as early as day 6 of differentiation upon OT stimulation. Flow cytometry and time course analysis of apparition of beating cell colonies were used to determine the activity of OT-X.

5.5. Materials and Methods

Cell culture and differentiation. The GFP-P19Cl6 cells, a gift from Dr. J. Moore (Hubrecht Laboratory, University Medical Center, Utrecht, The Netherlands) were cultured as described for parental P19 cells (Paquin, Danalache et al, 2002; Moore et al, 2004). They were grown on tissue culture dishes in complete α MEM medium consisting in α -modified Eagle's minimal essential medium (α MEM, GIBCO-BRL Burlington, Ontario, Canada) supplemented with 2.5% heat-inactivated fetal bovine serum, 7.5% heat-inactivated donor bovine serum (Cansera International, Rexdale, Ontario, Canada), and the antibiotics (GIBCO-BRL) penicillin (50 U/ml) and streptomycin (50 μ g/ml). The cultures were maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and passaged every 2 days.

For differentiation (Fig. 5.2), hanging drops containing 800 cells in a volume of 20 μ L of complete medium were plated in hanging drops onto the lid of bacteriological grade petri dishes (10 cm-diameter) and incubated at 37°C for 2 days in the absence (non-induced) or presence of inducers: OT (Bachem), 10⁻⁶M; DMSO (Sigma), 0.5% v/v; OT-Gly, OT-Gly-Lys and OT-Gly-Lys-Arg (synthesized by Peptide Synthesis & Protein Sequencing Core Facility of Eastern Quebec, Quebec), 10⁻⁶M. The base of each culture dish contained phosphate buffer saline (PBS) to prevent the drops from evaporating. After 2 days of incubation, embryoid bodies (Ebs) formed in drops were transferred in bacterial dishes with fresh differentiation medium and kept for 3 more days in suspension in the absence (non-induced) or the presence of inducers. On the 5th day, Ebs were collected and plated in complete α MEM medium in tissue culture dishes in absence of inducers until day 14. The medium was refreshed every 48 hours.

Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). Total cellular RNA was extracted with TRIzol Reagent (Invitrogen Life Technologies, Burlington, Ontario, Canada). First-strand cDNA was synthesized in a final volume of 40 μ L containing first-strand buffer, 3 μ g of cellular RNA, 4 μ L of hexanucleotide primers

(Amersham-Pharmacia, Baie d'Urfé, Quebec, Canada), and avian myeloblastosis virus reverse transcriptase (12 units/ μ g RNA; Invitrogen, Life Technologies). The first-strand cDNA (5 μ l) was then utilized for PCR amplification with OTR, or GAPDH exon-specific oligonucleotide primers in a Robocycler Gradient 40 thermocycler (Stratagene, La Jolla, CA). Conditions for RT-PCR analysis of GAPDH and OTR mouse transcripts have already been described (Paquin, Danalache et al, 2002). For all PCR studies, the number of cycles employed was within the linear range of amplification.

Cell morphology. Cell morphology was examined with an inverted Nikon microscope equipped for epifluorescence analysis. Micrographs were taken with a Nikon Coolpix 5000 camera. At day 8 the contracting cell colonies in fields of 3 independent samples were counted using recording video files analysis with ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

Fluorescence activated cell sorting (FACS) analysis. Dissociation of GFP-P19Cl6 cultures to single-cell suspensions was done with Accutase (Innovative Cell Technologies Inc, San Diego, CA) for adhered cells (days 6 and 14) or Accumax (Innovative Cell Technologies Inc, San Diego, CA) for suspended Ebs (day 5 of differentiation). The dissociated cells were washed with PBS, suspended in PBS containing Ca^{2+} (1 mM) and Mg^{2+} (0.5 mM) at room temperature, and filtered with sterile nylon cell stainer 70 μ m (Falcon; BD Bioscience, CA USA). GFP-positive cells were quantified by passage in a FACS Aria TM Cell Sorter (BD Bioscience) equipped with the BD FACS Aria software for data acquisition and analysis.

Statistics. Results are expressed as the means \pm SEM throughout. Comparisons were done using Student's t-test.

5.6. Results

Using the time schedule depicted in Figure 5.2, treatment of GFP-P19Cl6 cell aggregates with different concentrations of OT led to the formation of rhythmically beating cells (Fig. 5.3A). The 10^{-6} M concentration revealed to be the most efficient in inducing cardiomyogenesis. Treatment with OT was previously shown to increase OTR expression (Paquin, Danalache et al, 2002). The 10^{-6} M concentration was also the most efficient in this aspect (Fig. 5.3B). We therefore chose the micromolar concentration to compare the action of OT and OTX. Like for OT or DMSO treatment, treatment with OT-X induced the appearance of numerous colonies with cells organized in linear parallel arrays or round clusters displaying synchronized contractions (Fig. 5.4A, B). Cell cultures not exposed to inducer (NI) were not beating (Fig. 5.4A, B) although they sometimes showed very rare and very small beating foci (2-3 cell foci in 2/24 wells) (Fig. 5.4A). The beating cell formation, indicating the presence of functional CM, was observed earlier in the response to OT and OT-X (day 6) than DMSO (day 8) (Fig. 5.4A). The videoanalysis at day 8 (Fig. 5.4C) revealed significantly higher number of contracting cell colonies in samples induced by OT-GKR (9 ± 1) comparing to cells induced by OT (5 ± 1), OT-G (4 ± 0.6), OT-GK (7 ± 0.6) and DMSO (5 ± 1.5), these numbers referring to the number of colonies averaged from several microscopy fields. A similar profile is found in analysis of contractile area (Fig. 5.4D).

Further comparison shows that OT-GKR stimulated the production of beating cell colonies in 18 of 24 wells by 10 days whereas the same result was obtained in cells induced by DMSO only by 12 days. The number of wells at days 10-14 displaying contracting cells was similar in cultures stimulated with OT, OT-G, and OT-GK. Slightly higher number of contracting cells it was in cultures treated with OT-GKR. At all time points the number of wells containing beating colonies was lower in cells induced with DMSO than with OT and OT-X.

GFP fluorescence was also used to analyse the cardiomyogenic potential of differentiation inducers. Fluoromicrographs of day 8 cultures showed that cells induced with OT-X exhibited intensive GFP fluorescence-emitting areas identical to

those observed with OT-induced cultures (Fig.5.5.A). Similar but less intensive staining was found in DMSO-induced cells. GFP-positive areas were observed starting the day 2 after plating (day 6). As presented in Fig. 5.5.B and Fig.5.5.C, at different days of differentiation the flow cytometry analysis indicated very low number of fluorescent cells in non-induced cultures (0.6%). Effectively and similarly stimulated GFP-expressing cells were observed at day 14 after OT (54.8%), DMSO (53.1%), OT-G (54.5%), OT-GK (54.7%) and OT-GKR (55.2%) treatments. The day 5 results show the precocious efficiency of the OT-GKR treatment, the number of fluorescent cells being twice that of OT stimulated cultures (20% vs 10%).

5.7. Discussion

Our data demonstrated that OT-X are efficient CM inducers in the P19 embryonic stem cell model. This is the first study showing a potent biological action of these naturally-occurring OT precursor forms. The results raise the possibility that OT-X can contribute to heart development in the embryo even if the post-translational machinery of OT processing is not completely mature at the time of OT gene expression. The OT-X forms of the hormone could be produced in the developing heart since OT synthesis was demonstrated in cardiomyocyte cultures from newborn rats (Jankowski et al, 2004).

The cell morphology and GFP fluorescence results indicated similar cardiomyogenic action of OT and OT-X. For the moment, this action relates to differentiation to the ventricular CM phenotype since the GFP-P19Cl6 model allows to follow and quantitate differentiation controlled by the ventricularly directed MCL-2v promoter (Moore et al, 2004). Nevertheless, the potential of OT and OT-X to promote the ventricular phenotype is of direct interest in the development of cell therapies for the heart, especially heart injured by an infarct since this condition adversely affects CM of the ventricle (Kannel, 2000). In addition to promoting the cardiomyogenic differentiation of embryonic stem cells, the OT-X peptides have the potential to induce cardiac differentiation of somatic stem cells of the adult heart since these cells were shown to respond in such a way to OT itself (Matsuura et al, 2004).

The question can be raised as to whether OT-X cardiomyogenic action was a result of their cleavage to the size of the OT peptide by proteolytic activity potentially present in P19 cultures. This would seem unlikely since OT-GKR, the longest OT-X form studied, displayed the most precocious differentiating effect. The fact that OT and OT-X treatments induce cardiomyogenesis to a similar extent at later times suggests that the C-terminal portion of the hormone may be not essential for this function. This is to be contrasted with OT-X having weaker effects than OT on uterine contractions (Mitchell et al, 1998). Mechanisms responsible for the distinct or similar peptide behaviors depending upon the situation would require further investigation. In the same line of reasoning, it is possible that OT-X exhibit different

efficiency of action as compared to OT with respect to other OT functions in the heart, such as stimulation of the release of the vasodilating atrial natriuretic peptide (Gutkowska et al, 1997). If this reveals to be the case, we can speculate that the relative levels of OT and OT-X (and hence, the relative levels of OT processing enzymes) can have finely tuned regulatory impact on heart development and homeostasis.

In summary, the present study demonstrates that the OT-X peptides have a cardiomyogenic action which can be of physiological importance in the development of heart during the fetal life. It also reveals for the first time the functionality of OT biosynthetic precursors and points to the use of OT-X in addition to OT in the development of therapeutic strategies for the heart.

Acknowledgements

We would like to thank Dr. Mummery and Dr. Moore for providing P19Cl6-GFP cells and Dr. S. Gimming (CHUM) for assistance in FACS analysis. B.D. was the holder of a studentship from Université du Québec à Montréal. This work was supported by a CHIR-NET grant to J.G., M.J. and J.P., and CHIR grants to J.G. and M.J.

5.8. References

1. Alstein M, Whitnall MH, House S, Key S, Gainer H. (1988) An immunochemical analysis of oxytocin and vasopressin prohormone processing in vivo. *Peptides.*; **9**(1):87-105.
2. Altstein M, Gainer H. (1988) Differential biosynthesis and posttranslational processing of vasopressin and oxytocin in rat brain during embryonic and postnatal development. *J Neurosci.*; **8**(11):3967-77.
3. Gainer H. (1983) Precursors of vasopressin and oxytocin *Prog Brain Res.*; **60**:205-15.
4. Gimpl G, Fahrenholz F. (2001) The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev.*; **81**(2):629-83.
5. Gutkowska J, Jankowski M, Lambert C, Mukaddam-Daher S, Zingg HH, McCann SM. (1997) Oxytocin releases atrial natriuretic peptide by combining with oxytocin receptors in the heart. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; **94**(21):11704-9.
6. Jankowski M, Danalache B, Wang D, Bhat P, Hajjar F, Marcinkiewicz M, Paquin J, McCann SM, Gutkowska J. (2004) Oxytocin in cardiac ontogeny. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; **101**(35):13074-9.
7. Kannel WB. (2000) Vital epidemiologic clues in heart failure. *J Clin Epidemiol.*; **53**(3):229-35.
8. Matsuura K, Nagai T, Nishigaki N, Oyama T, Nishi J, Wada H, Sano M, Toko H, Akazawa H, Sato T, Nakaya H, Kasanuki H, Komuro I. (2004) Adult cardiac Sca-1-positive cells differentiate into beating cardiomyocytes. *J Biol Chem.*; **279**(12):11384-91.
9. Mitchell BF, Fang X, Wong S. (1998) Oxytocin: a paracrine hormone in the regulation of parturition? *Rev Reprod.*; **3**(2):113-22.
10. Mitchell BF, Fang X, Wong S. (1998) Role of carboxy-extended forms of oxytocin in the rat uterus in the process of parturition. *Biol Reprod.*; **59**(6):1321-7.
11. Moore JC, Spijker R, Martens AC, de Boer T, Rook MB, van der Heyden MA, Tertoolen LG, Mummery CL. (2004) A P19Cl6 GFP reporter line to quantify cardiomyocyte differentiation of stem cells. *J Dev Biol.*; **48**(1):47-55.

12. Morris M, Castro M, Rose JC. (1992) Alterations in oxytocin prohormone processing during early development in the fetal sheep. *Am J Physiol.*; **263**(3 Pt 2):R738-40.
13. Mueller-Heubach E, Morris M, Rose JC. (1995) Fetal oxytocin and its extended forms at term with and without labor. *Am J Obstet Gynecol.*; **173**(2):375-80; discussion 380-1.
14. Paquin J, Danalache BA, Jankowski M, McCann SM, Gutkowska J. (2002) Oxytocin induces differentiation of P19 embryonic stem cells to cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**(14):9550-5.

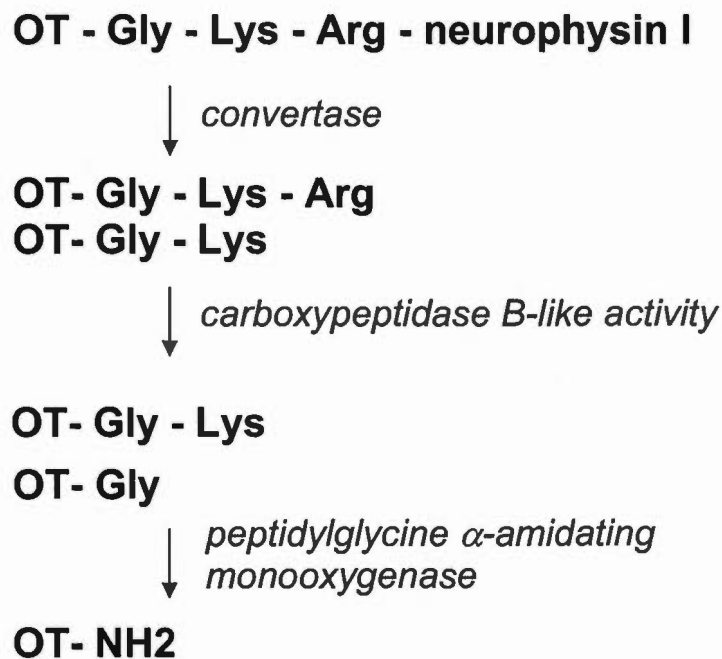


Figure 5.1. Schema of OT biosynthesis. The pro-OT precursor comprising the OT and neurophysin I sequences hyphenated by three amino acid residues undergoes proteolytic cleavage leaving C-terminally elongated OT intermediates. Final bioactivation requires amidation of the OT-Gly intermediate.

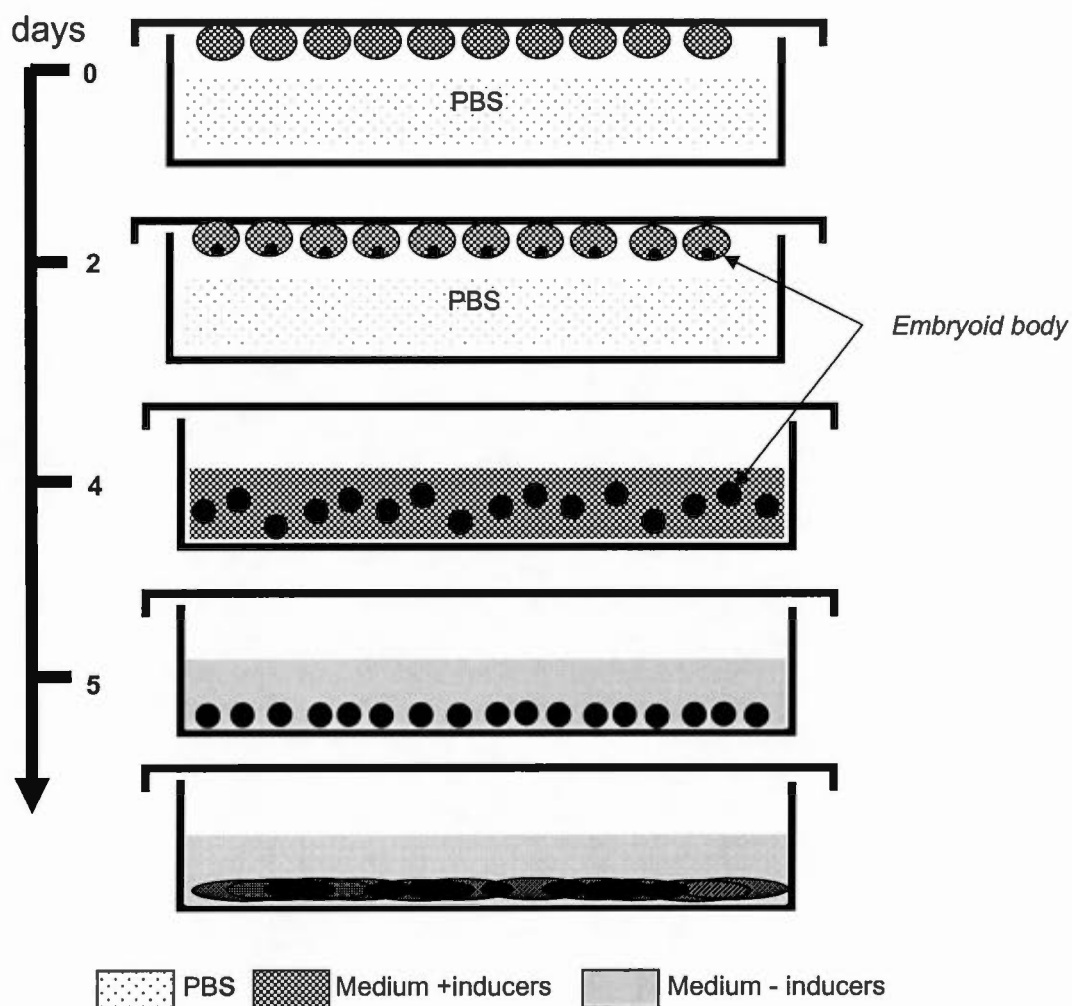


Figure 5.2. Time schedule of inducing treatment. Cells were cultivated as aggregates from day 0 to day 5 in the presence of DMSO (0.5% w/v), OT (10^{-6} M) or OT-X (10^{-6} M) as the agent inducing differentiation. Aggregates were formed in hanging drops from day 0 to day 2 and grown in suspension in larger volumes of culture medium from day 2 to day 5. At day 5, the aggregates were transferred to tissue culture dishes, and grown in absence of agents.

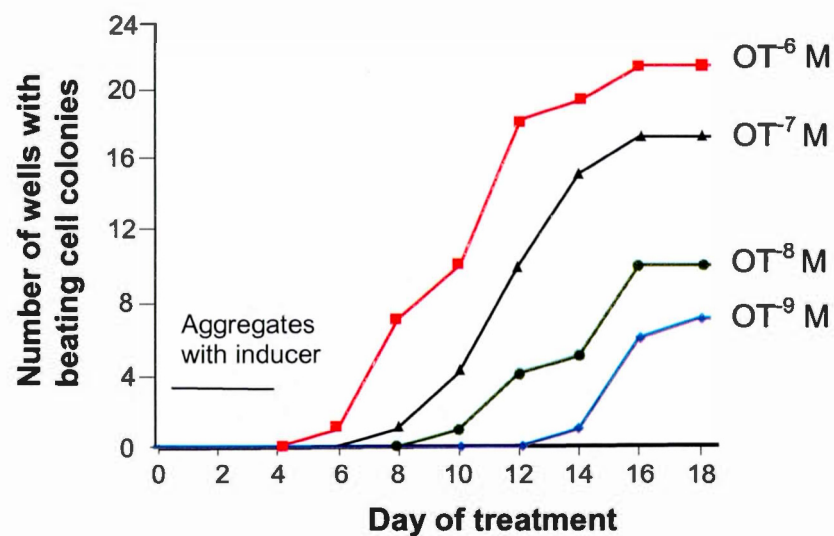
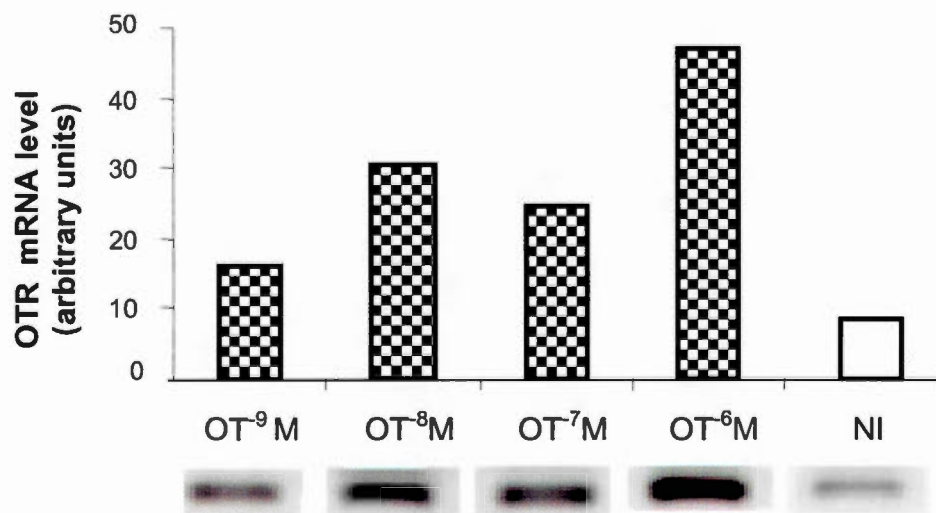
A**B**

Figure 5.3. The cardiomyogenic effect of OT according to concentration. **(A)** Generation of beating cell colonies of P19 cells after induction with different concentrations of OT (representative study). **(B)** RT-PCR analysis of OTR at day 14.

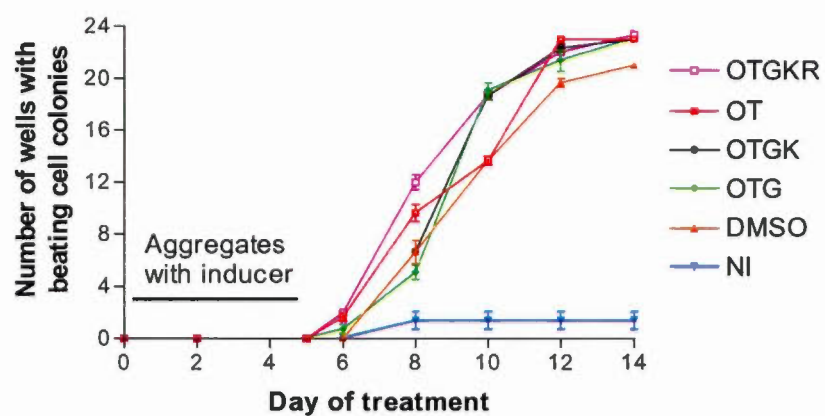
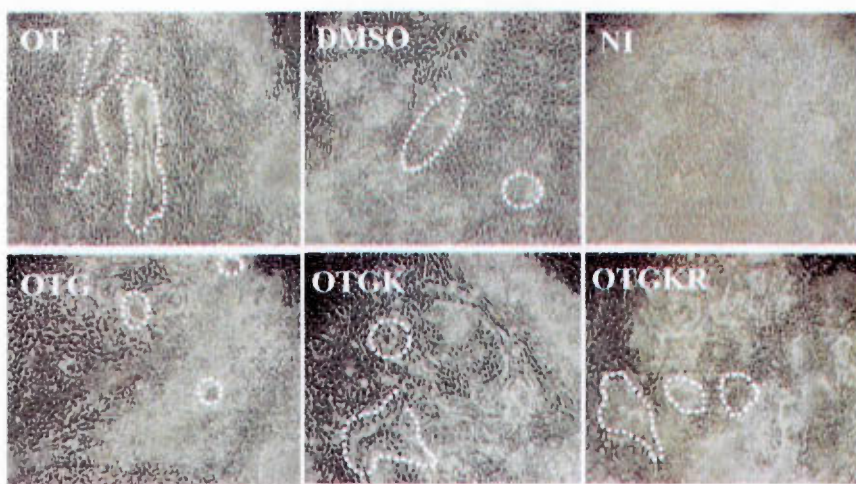
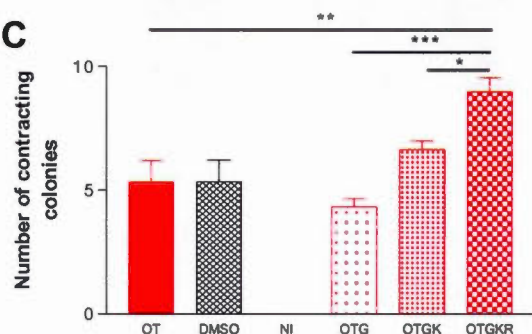
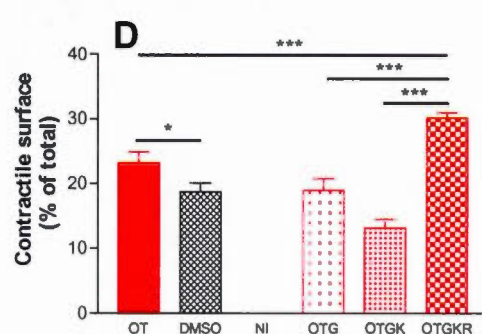
A**B****C****D**

Figure 5.4

Figure 5.4 Generation of beating cell colonies after induction with OT and OT-X. **(A)** Time course of appearance of beating cell colonies. At day 5, each culture was transferred into a 24-well tissue culture dish and scored every 2 days for the presence of beating colonies. Results are expressed as the means \pm SEM of 3 independent studies. **(B)** Micrographs (100X magnification) show day-10 cultures following each treatment, with dotted lines encircling beating colonies. NI, non-induced. OT-GKR is the most efficient form in cardiac differentiation based on **(C)** the number of contracting colonies and **(D)** the relative contractile area, at day 8. The results (means \pm SEM) were obtained from 6 microscope fields in a representative cell differentiation series. Statistically significant differences: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), and *** ($p < 0.001$). NI was significantly different ($p < 0.001$) from all other treatments.

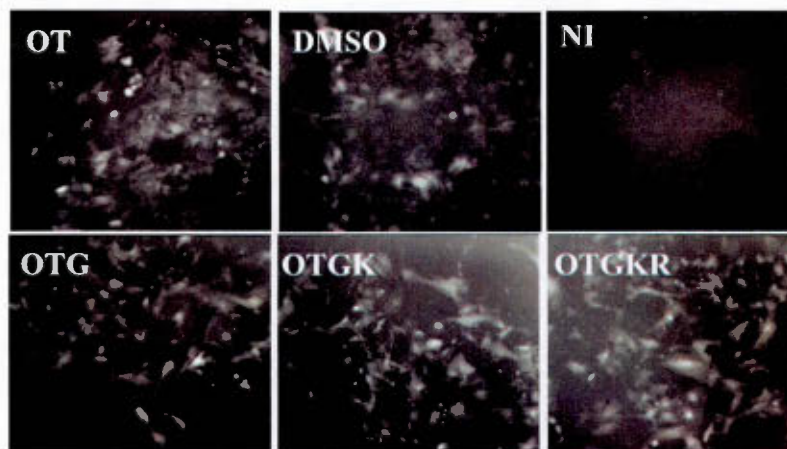
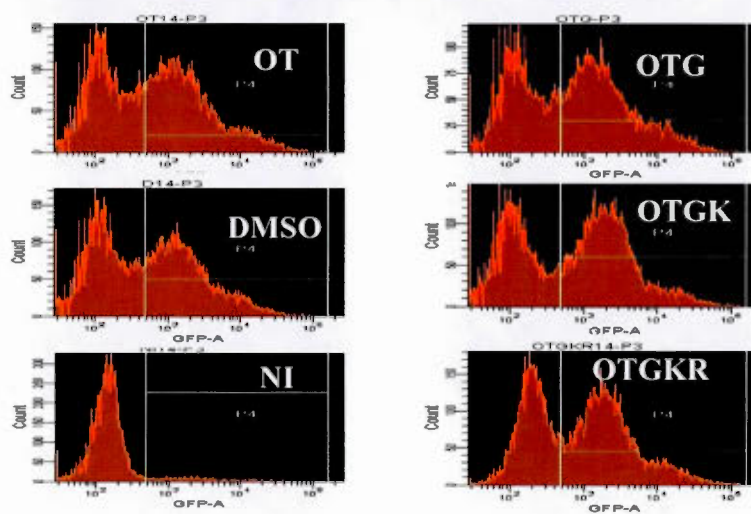
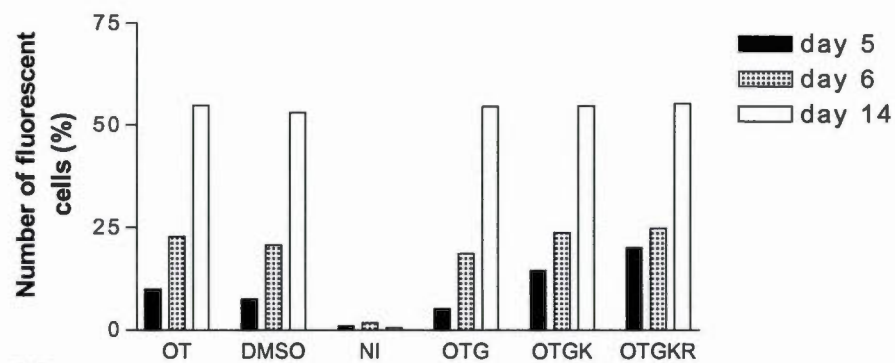
A**B****C****Figure 5.5**

Figure 5.5 GFP fluorescence of OT and OT-X induced cells. **(A)** Fluoromicrograph (100X magnification) of day 8 cultures. **(B)** Representative flow cytometry analysis at day 14 of fluorescence emitting GFP-P19Cl6 cells in non-induced (NI) control cultures and in cultures induced with OT, DMSO, OT-G, OT-GK, and OT-GKR. **(C)** Time course of GFP expression at different days determined by FACS. The bars quantitatively illustrate means of 3 independent experiments.

Chapitre VI

DISCUSSION GÉNÉRALE

L'ensemble des travaux de la thèse a permis de démontrer que:

- OT induit la cardiomyogénèse de cellules souches embryonnaires P19 via un mécanisme dépendant de OTR,
- OT et OTR sont impliqués dans l'action cardiomyogénique du DMSO et de RA,
- NO est impliqué dans le mécanisme de l'action cardiomyogénique de OT/OTR, et
- les intermédiaires biosynthétiques de OT, les OT-X, sont aussi cardiomyogéniques.

Ces résultats permettent donc de postuler un rôle de OT dans le développement du cœur et soulignent le potentiel thérapeutique de OT dans le traitement de maladies cardiaques.

6.1 Le système OT/OTR dans la cardiomyogénèse et ses relations possibles avec le DMSO et le RA

Le mécanisme de différenciation cardiaque est un processus d'une complexité extraordinaire et encore incomplètement compris. On connaît peu d'agents qui induisent la différenciation cardiomyogénique *in vitro*. Au début de ce travail, il avait été démontré par d'autres chercheurs que RA, T3, la dynorphine et le DMSO (non-physiologique) avaient ce pouvoir. Contemporainement au travail sur OT, deux études ont présenté, l'une, la vitamine C (l'acide ascorbique) comme nouvel inducteur cardiaque dans une action indépendante de ses capacités antioxydantes

(Takahashi et al, 2003) et l'autre, NO comme un autre inducteur cardiaque (Kanno et al, 2004).

Nous nous sommes intéressés à OT comme agent cardiomyogénique sur la base des observations suivantes:

- OT est une hormone reliée à la gestation,
- OT et OTR sont exprimés dans des structures reliées à l'embryon précoce,
- OT est présente à des niveaux élevés dans les cœurs de nouveaux-nés,
- l'injection de OT à des brebis gestantes a accéléré le développement du cœur.

Les résultats de cette thèse ont démontré que OT induit une différenciation cardiaque et son action est médiée par OTR puisqu'elle est bloquée par OTA. OT peut agir comme messenger neuroendocrinien ou neurotransmetteur (affection, mémoire) et comme substance avec une action endocrine (parturition). Des études antérieures de l'équipe de Dr Gutkowska ont montré que le cœur produit OT et que la perfusion du cœur isolé avec OT induit la sécrétion d'ANP (Gutkowska et al, 1997). Ces études sont en accord avec une action paracrine de OT dans le fonctionnement cardiaque. On peut envisager maintenant que OT peut avoir aussi une action paracrine et même autocrine dans le développement cardiaque (différenciation de cellules souches en cardiomyocytes), probablement par OT de source cardiaque.

D'autre part, OTA bloque aussi l'action cardiomyogénique du DMSO et de RA, suggérant une implication de OT/OTR dans l'action de ces inducteurs. *In vivo*, le système OT/OTR de cœur foetal s'est montré sensible à RA, reconnu comme un morphogène cardiaque majeur (Wobus et al, 1997, Niederreither et al, 2001, Lai et al, 2003). Les résultats d'analyse du système OT/OTR dans le cœur supportent l'hypothèse que RA induit une cardiomyogénèse par régulation de ce système en mode direct ou indirect. RA, la forme active de la vitamine A (rétinol), règle la croissance et le développement chez les vertébrés en se liant à des récepteurs nucléaires RAR et RXR, et les différents complexes affectent l'expression des gènes. Des malformations cardiaques ont été observées dans le cœur en voie de développement chez les rats qui ont manqué de vitamine A et ces malformations

sont corrigées par administration de vitamine A pendant la gestation (Zile, 2001). D'autre part, RA en excès peut aussi causer des malformations cardiaques, ceci a été observé chez des enfants dont les mères ont pris l'analogue de la vitamine A pendant la première semaine de grossesse (Lammer et al, 1985). Récemment, une autre étude sur la vitamine A (Kawakami et al, 2005) a montré que cette vitamine peut influencer la symétrie de l'organisme pendant le développement embryonnaire, et on peut dire que probablement elle aurait une importante influence pour la symétrie du cœur.

Quel pourrait être le lien entre le DMSO et OT/OTR? Ce lien n'est pas connu mais il est possible de faire quelques suggestions. Le cholestérol contribue à la fluidité des membranes, et est également un précurseur de nombreuses hormones dont les œstrogènes, la testostérone et la vitamine D3 qui permet l'absorption de Ca^{2+} par l'intestin (Anderson, 2003). Le cholestérol et les stéroïdes ont une influence sur OTR (Gimpl et al, 2002). Le cholestérol agit comme un modulateur allostérique de OTR en stabilisant les membranes cellulaires et OTR dans un état de haute affinité pour les agonistes et les antagonistes. Il est possible que le DMSO, qui passe les barrières lipidiques des cellules induise un changement de la conformation de OTR et ainsi augmente l'affinité pour OT. Nous avons fait une expérience de liaison sur des cellules P19 pour examiner si DMSO affecterait l'affinité de OTR pour OTA et il semblerait que ce n'est pas le cas.

Il est possible aussi que le DMSO induise la création de canaux de perméabilité favorisant l'entrée de substances inductrices présentes dans les milieux de culture des cellules P19. Le DMSO pourrait aussi activer certains des voies de signalisation activées par OT. Les cellules P19 stimulées par DMSO augmentent leur concentration de calcium intracellulaire (Morley et Whitfield, 1993). OT a le même effet dans certains modèles cellulaires comme les cellules endothéliales (Sano et al, 2005), les neurones ocytocinergiques (Kombian et al, 2002), les cellules de muscle lisse de l'utérus (Sperelakis et al, 1992), et des cellules tumorales (Cassoni et al, 2004). Par microscopie confocale, en utilisant le FURA-2 (acétoxy-méthyl ester) qui a la propriété de se lier aux ions Ca^{2+} , nous pourrions déterminer si OT cause une

augmentation du Ca intracellulaire libre dans les cellules P19. Une expérience préliminaire suggère que ce serait le cas.

La relation entre OT et T3 est aussi inconnue dans la différenciation cardiaque mais il existe des relations entre ces deux substances dans d'autres situations. Le dysfonctionnement de la glande thyroïde (hypo- ou hyper-thyroïdisme) affecte la libération de OT et de VP par le système hypothalamo-neurohypophysaire et l'équilibre du métabolisme hydrique (Ciosek et Drobnik, 2004). L'hormone stimulatrice de la thyroïde (TSH) et les hormones thyroïdiennes peuvent être impliquées dans certains des effets métaboliques en réponse à OT comme la croissance osseuse, le développement mental, la stimulation de la consommation d'oxygène par les tissus, la transformation des graisses et des sucres (Petersson M, 2002). Le traitement de rats avec T3 a augmenté le niveau d'ARNm de OT hypothalamique (Adan et al, 1992). Une augmentation semblable pourrait se produire dans le cœur en développement. Nous pourrions déterminer si un traitement de cellules P19 avec la vitamine C induit la synthèse de OT.

Des travaux ont rapporté une action cardiomyogénique de la vitamine C. Pourrait-il y avoir un lien entre la vitamine C et OT/OTR ? Les cellules de Leydig de cobaye qui synthétisent la testostérone à partir du cholestérol au niveau des testicules sont influencées par l'axe hypothalamo-hypophysaire; *in vitro* elles produisent OT *de novo* si elles sont stimulées avec de l'ascorbate à des concentrations de 0,25 à 50 μ M (Kukucka et Misra, 1992).

Le rôle de l'opioïde dynorphine dans la différenciation cardiaque a été démontré dans le modèle P19 (Ventura et Maioli, 2000). Une possible relation entre OT et la dynorphine dans le développement du cœur est aussi inconnue mais il existe une relation entre OT et des peptides opioïdes dans d'autres circonstances. Comme OT et VP, l'enképhaline est contenue dans la partie postérieure de l'hypophyse (Zheng et al, 2005). La sécrétion d'enképhalines agit probablement comme un signal de rétroaction (feed-back) pour limiter la sécrétion d'hormone. Les récepteurs d'opioïdes kappa et mu ont été détectés dans des populations neuronales qui produisent VP (Shuster et al, 2000; Zheng et al, 2005). L'effet analgésique induit par

OT est médié par des récepteurs opioïdes (Gao et Yu, 2004, Zubrzycka et al, 2005). Il est possible d'inhiber la sécrétion de VP ou de OT par administration d'opiacés dans l'hypophyse (Smith et Wise, 2001). Les opioïdes règlent le développement de sous-populations de cellules gliales (Stiene-Martin et al, 2001) d'oligodendrocytes (Knapp et al, 2001), de cellules cancéreuses (Zagon et McLaughlin, 2005).

Nous pouvons nous demander si l'action cardiomyogénique de OT implique ANP sachant que OT stimule la sécrétion de l'ANP cardiaque (Gutkowska et al, 1997) et que ANP agit sur la croissance de certaines cellules. Ainsi, récemment, ANP a été montré comme un facteur de croissance du cartilage (Tanaka et al, 2002). Une action cardiomyogénique possible de ANP pourrait être évaluée avec le modèle P19.

D'après les résultats que nous avons obtenus avec OT, il est possible de penser que VP, l'hormone très similaire à OT, soit capable aussi de générer des cardiomyocytes, surtout sachant que OTR a une affinité équivalente pour OT et VP. La VP a trois récepteurs membranaires qui appartiennent comme OTR à la famille des récepteurs couplés aux protéines G : V1a, V1b et V2, et qui sont capables de lier OT. Hupf et ses collaborateurs (1999) ont montré la présence *de novo* de VP dans les cœurs de rats de 9 semaines. Dans les vaisseaux sanguins, VP se lie sur des récepteurs V1b et induit, via des protéines G, l'activation d'une phospholipase C (PLC) et l'augmentation de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire, un mécanisme analogue à celui de OT (Holmes et al, 2004). La stimulation des fibroblastes cardiaques des rats nouveaux-nés avec la VP a montré une induction de la prolifération cellulaire médiée par son récepteur, ce qui correspond au phénomène d'hyperplasie. V1 est aussi présent dans les cardiomyocytes et des expériences ont montré que la VP provoque l'hypertrophie de ces cellules par la stimulation directe de la synthèse protéique (Yang et al, 2003). Ces effets sont induits par la voie de transduction IP_3 et par la libération de $[Ca^{2+}]$ intracellulaire (Brostrom et al, 2001). VP stimule aussi la prolifération d'ostéoblastes et probablement NO est impliqué dans les effets de cette prolifération cellulaire. En effet, VP a augmenté la prolifération de ces cellules dans des souris $eNOS^{-/-}$ seulement quand SNAP a été ajouté, et L-NAME a diminué la prolifération cellulaire induite par VP (Lagumdzija et al, 2005). Il

serait intéressant d'analyser le profil d'expression génique de V1a, V1b et V2 et OTR dans les cellules P19, d'étudier la capacité de ces cellules à lier chaque hormone, et de comparer par électrophysiologie le type de cellules cardiaques (auriculaires, ventriculaires) générés par les 2 hormones. Dans des études plus approfondies, nous pourrions déterminer quels récepteurs sont impliqués particulièrement dans le contrôle cardiomyogénique en utilisant l'ARN d'interférence pour OTR, V1 et V2 ou l'effet d'inhibiteurs spécifiques.

6.2 L'implication de NO dans l'action cardiomyogénique de OT/OTR

Récemment Thibonnier et al. ont proposé que l'activation de OTR dans les cellules de l'endothélium humain implique NO. En effet, OT cause une relaxation vasculaire dépendante du Ca^{2+} via une production de NO et stimule la prolifération de cellules endothéliales HUVEC (Thibonnier et al, 1999). La production de NO dans les HUVECs a été induite avec 10^{-6}M et 10^{-5}M OT (Sano et al, 2005). NO induit la différenciation de plusieurs types cellulaires, incluant des neurones (Contestabile et Ciani, 2004) et des cellules tumorales (Lechner et al, 2005), et accélère la différenciation de cellules ES en cardiomyocytes (Bloch et al, 1999; Kanno et al, 2004). Les protéines iNOS et eNOS ont été observées dans le coeur pendant le développement embryonnaire dès le jour 9,5, et cela a été mis en corrélation avec une haute expression de la Guanylyl Cyclase soluble (sGC) et de cGMP. Cette expression prédominante de NOS diminue avant la naissance, suggérant qu'une exposition de NO à des moments critiques est nécessaire pour un développement normal. Les souris qui sont modifiées génétiquement en $\text{eNOS}^{-/-}$ ont des malformations congénitales du coeur (Feng et al, 2002). NO est considérée comme une molécule clé dans la signalisation du coeur embryonnaire (Malan et al, 2004). Les travaux avec des cellules ES de souris ont montré que des inhibiteurs de NOS arrêtent la différenciation vers un phénotype cardiaque et que cet effet peut être renversé par des générateurs de NO (Bloch et al, 1999). Une autre étude a montré (Kanno et al, 2004) que l'utilisation de S-nitroso-N-acétylpénicillamine (SNAP) comme source exogène de NO a une action cardiomyogénique.

Dans nos études, nous avons confirmé que SNAP a une forte action cardiomyogénique et démontré qu'il renverse l'effet inhibiteur de L-NAME sur l'action cardiomyogénique de OT. De façon surprenante des inhibiteurs de NOS et sGC ont une faible action cardiomyogénique. Cependant, ces inhibiteurs ne permettent pas une différenciation avancée puisque il y a peu ou pas expression de MHC et DHPR. La cardiomyogénèse est un processus essentiel, le premier organe à se développer étant le cœur, un organe musculaire qui assure la circulation du sang dans tout l'organisme et permet aux cellules de recevoir de l'oxygène et des nutriments et de se débarrasser des toxines. Il reste à comprendre la balance des effets négatifs et positifs de NO dans la cardiomyogénèse.

6.3. Les peptides OT-X sont cardiomyogéniques

L'étude présente sur les OT-X démontre pour la première fois une fonction physiologique de ces peptides. En effet, les OT-X induisent la différenciation des cellules souches P19 en cardiomyocytes et OT-GKR s'est révélée être la forme la plus efficace dans ce processus. Mitchel et al (1998) ont indiqué par des études de liaison que ces molécules ont une faible affinité pour OTR. Ils ont aussi montré que ces molécules sont incapables de stimuler les contractions de l'utérus. Il demeure inconnu si l'action cardiomyogénique des OT-X passe par OTR seulement ou pourrait dépendre d'autres récepteurs, ceux de la VP en particulier. Il a été rapporté que OTA se lie à un site différent de OT sur OTR et on peut se questionner sur la préférence des OT-X à se lier au site OT ou au site OTA (Gimpl et Fahrenholz, 2001). Des formes OT-X sont présentes dans le cerveau en développement et dans le plasma foetal (Altstein et Gainer, 1988; Altstein et al, 1988; Morris et al, 1992) mais il reste à déterminer si ces formes sont présentes aussi dans le cœur en développement. OT-X pourraient être produites par des cellules cardiaques foetales puisque la synthèse de OT a été démontrée dans des cultures de cardiomyocytes de rats nouveaux-nés. Comme les OT-X ont une activité utérotonique très faible sur l'utérus, ils pourraient être utilisés préférentiellement à OT pour des thérapies ciblant le cœur. Une expression différentielle de OTR et des récepteurs de VP pourrait influencer le spectre d'action des OT-X sur diverses cellules ou tissus. D'autres

analogues de OT pourraient être investigués en relation avec la cardiomyogénèse. Chez le rat, le tripeptide C-terminal de OT (prolyl-leucyl-glycinamide ou PLG) utilisé à des doses 10X plus grandes que OT et l'acide tocinoïque (les 6 résidus formant la structure cyclique de OT) peuvent induire les mêmes effets que OT: diminution de la pression sanguine diastolique, de l'activité locomotrice et de la sécrétion de la gastrine (Petersson et al, 2004). Fait intéressant, PLG peut interagir avec les récepteurs opioïdes (Petersson et al, 2004).

Les résultats obtenus avec OT-X soulèvent aussi l'implication possible des enzymes de la synthèse et du catabolisme de OT dans le développement du cœur. Les cellules P19 non différenciées et leurs dérivées différenciées expriment différentes convertases et ont différents profils de conversion de précurseurs (Jeannotte et al, 1997; Bolduc et al, 1997; Petit-Turcotte et Paquin, 2000; Cadet et Paquin, 2000). L'ARNm de la carboxypeptidase D (CPD), une enzyme ayant une activité similaire à celle de la carboxypeptidase E, est très abondant dans les oreillettes du cœur (Xin et al, 1997) et la protéine peut agir sur la molécule pro-ANP (Thibault et al, 1989). L'enzyme d'amidation PAM a été détectée *in vitro* dans des myoblastes cardiaques (Girard et al, 1999). La P-LAP/ocytocinase/cystéine aminopeptidase, qui hydrolyse en premier lieu le lien Cys₁-Tyr₂ de OT (Fig. 6.1), est considérée comme un marqueur important du développement fœtal. En effet, sous l'influence de l'agrandissement de la cavité utérine, l'hypothalamus maternel produit des hormones qui induisent une synthèse croissante de P-LAP dans le placenta pour prévenir l'accumulation de OT dans le sang à un niveau qui pourrait provoquer des contractions utérines (Klimek et al, 2001). En conséquence, l'ouverture de l'anneau de OT par la P-LAP abolit l'activité biologique de l'hormone. Il existe une autre voie catabolique de OT catalysée par la post-proline-endopeptidase qui coupe entre la proline₇ et la leucine₈ libérant la séquence leucine-glycine de la molécule (Fig. 6.1). D'autres voies de dégradation de OT impliquent une carboxypeptidase qui couperait les acides aminés C-terminaux de l'OT ou de ses fragments, et une possible destruction enzymatique du pont disulfure (Mitchel et al, 1998).

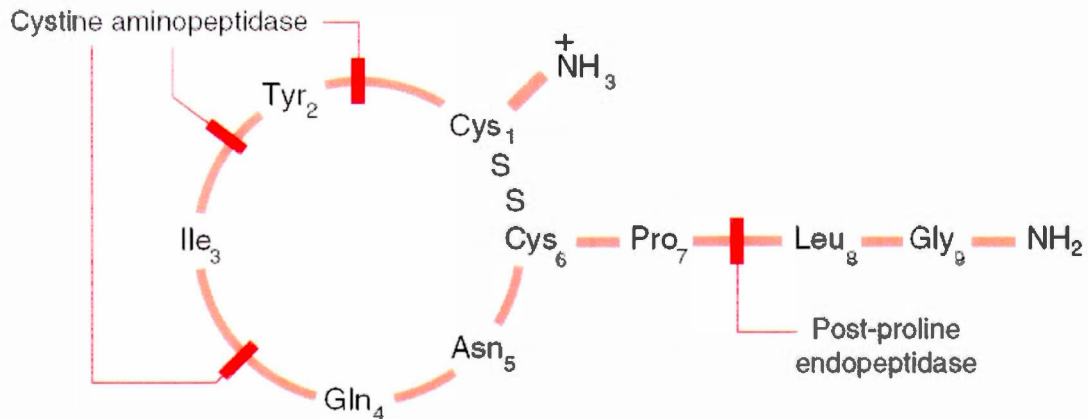


Fig. 6.1. La dégradation de OT (*Adapté de Mitchel et al, 1998*)

Chez la souris, la protéine et l'ARNm de P-LAP sont bien exprimés dans le placenta, ainsi que dans les cellules hématopoétiques embryonnaires (Kobayashi et al, 2004). Il existe une homologue membranaire de la P-LAP, c'est l'aminopeptidase membranaire (Tsujimoto et Hattori, 2005; Keller et al, 2004) régulée par l'insuline (IRAP). Cet homologue, hydrolyse aussi OT (Tsujimoto et al, 1992) en plus d'autres substrats comme la VP, la lys-bradykinine, les angiotensines III et IV, et la dynorphine (Matsumoto et al, 2001, Mitsui et al, 2004). IRAP hydrolyse la cystine N-terminale de OT et VP.

6.4 Impact et perspectives

Les maladies cardiovasculaires, en particulier les maladies du cœur et les accidents cérébrovasculaires (ACV) sont, avec le cancer, la première cause de décès au Canada. Environ 40 000 à 50 000 Canadiens sont victimes d'un ACV et 23 000 Canadiens meurent d'une crise cardiaque, la moitié d'entre eux en deux heures. Avec l'âge, le cœur devient peu à peu incapable d'assurer sa fonction de glande endocrine et de pompe assurant la circulation sanguine. Certaines maladies diminuent la capacité d'éjection du cœur (infarctus ou cardiomyopathie) ou accroissent la résistance à l'écoulement du sang (hypertension artérielle). Ceci résulte en l'apparition d'une insuffisance cardiaque qui entraîne, par mécanisme réflexe, une hypertrophie et une dilatation des cavités cardiaques. Malgré les

progrès de la cardiologie et de la chirurgie cardiaque, pour certains patients, même le meilleur traitement médicamenteux ne parvient tout au plus qu'à stabiliser la maladie. Souvent, avec le temps, le traitement devient moins efficace et l'activité des cellules cardiaques plus limitée. La transplantation cardiaque reste le traitement ultime de l'insuffisance cardiaque terminale. Cette situation explique l'intérêt pour la thérapie cellulaire qui peut constituer une alternative à la greffe d'organes. Dans le monde, il y a des efforts multiples pour comprendre l'évolution et le développement du système cardiovasculaire, les mécanismes de régulation et fonctionnement de ce système, le traitement et la prévention des maladies qui l'affectent. Les résultats du présent projet permettront en premier lieu de mieux comprendre les mécanismes du développement cardiaque. De plus, ils pourraient conduire à des applications thérapeutiques visant à régénérer le cœur ischémique ou endommagé par une maladie cardiovasculaire. En conséquence, les connaissances sur les mécanismes développementaux pourraient inspirer des stratégies basées sur la réactivation de ces mécanismes. Les thérapies peuvent impliquer l'injection de OT, l'implantation de cardiomyocytes générés par OT in vitro, ou l'injection du gène de OT. Dans le cas d'implantation de cardiomyocytes, on pourrait induire une différenciation cardiaque à partir de cellules souches adultes de façon à réaliser des greffes autologues. L'utilisation de cellules souches en thérapie demande des essais et vérifications multiples. Nos travaux montrant l'action cardiomyogénique de OT (Paquin, Danalache et al, 2002) ont été remarqués par des groupes de chercheurs oeuvrant dans les domaines de la différenciation cellulaire et des thérapies cellulaires pour le cœur (Lev et al, 2005; Singla et Sobel, 2005; Liu et al, 2005; Adameyko et al, 2005; Reversi et al, 2005; Devost et al, 2005; Vignozzi et al, 2005; Choi et al, 2004; Ohlsson et al, 2004; Heng et al, 2004; Matsuura et al, 2004; Moore et al, 2004; Holmes et al, 2003; Naito et al, 2003; Goette et al, 2003; Carter et al, 2003; Rimoldi et al, 2003; Zhong et al, 2003; van der Heyden et Defize, 2003; Goldenthal et Marin-Garcia, 2003; Nakamura et al, 2003). Matsuura et al (2004) ont examiné l'effet de OT sur des cellules cardiaques Sca-1⁺ considérées comme des cellules souches résidentes du cœur. Quand ces cellules sont stimulées avec l'OT, elles expriment des marqueurs cardiaques comme GATA-4, MEF-2 et des protéines contractiles, et

montrent des structures sarcomériques et des battements spontanés plus efficaces que lorsqu'elles ne sont pas stimulées (Matsuura et al, 2004). On peut donc imaginer que l'injection directe de OT dans le cœur blessé pourrait stimuler la régénération de l'organe en agissant sur les cellules souches locales. On considère que l'hyperplasie impliquée dans l'hypertrophie cardiaque est causée par une prolifération de cellules souches (Urbanek et al, 2003). Les cellules souches adultes existent en nombre infime dans plusieurs tissus de l'organisme incluant le cœur. Elles sont engagées partiellement dans un programme tissulaire spécifique, elles ne sont pas identiques à leurs homologues embryonnaires. On pense de plus en plus que les cellules souches des tissus adultes (cellules souches somatiques) assurent l'homéostasie physiologique d'un tissu en remplaçant les cellules épuisées de l'organe; elles seraient en général "programmées" pour un tissu donné. Les cellules souches cardiaques peuvent être transdifférenciées en cellules endothéliales, cellules de muscle lisse et cardiomyocytes, et régénérer le cœur dans un modèle d'infarctus chez le rat (Beltrami et al, 2003). Jusqu'à récemment, le cœur a été considéré comme un organe incapable de se régénérer mais il existe une possibilité de régénération des myocytes ventriculaires dans le cœur adulte en condition normales et pathologiques (Kajstura et al, 1998). Autour de la région d'infarctus, chez 4% des cardiomyocytes, les noyaux expriment Ki-67 un marqueur de prolifération cellulaire (Beltrami et al, 2003). Les cellules souches cardiaques sont petites (6 μm de diamètre), sont de phénotype Lin^- , c-kit^+ , Sca-1^+ , CD45^- , CD34^- , et sont localisées spécialement dans l'apex ventriculaire. La gravité des dommages causés par l'infarctus laisse penser que les cellules souches cardiaques ne sont pas en nombre suffisant pour réparer complètement le cœur.

La thérapie cellulaire est aujourd'hui utilisée dans le domaine de l'hématologie (autogreffes médullaires de cellules souches hématopoïétiques), des brûlures (greffe de peau) et, dans un stade plus expérimental, la transplantation de cellules musculaires dans le cœur, la transplantation d'hépatocytes pour les maladies hépatiques, de cellules du pancréas endocrine pour le diabète et de cellules neuronales pour différentes affections neurodégénératives. Des études récentes ont montré une nette amélioration fonctionnelle chez les animaux, et chez les humains

traités. La transplantation des cellules cardiaques permet non seulement à des patients de survivre, mais elle améliore aussi leur qualité de vie. La recolonisation des cicatrices d'infarctus par de nouvelles cellules qui peuvent remplacer des cellules qui ont été endommagées permettrait une possible réparation du cœur et un retour à la vie normale. Enfin, on pourrait éventuellement envisager la correction de maladies cardiaques périnatales.

L'examen des relations existant entre cellules souches et facteurs de différenciation pourrait mener dans le futur, à étudier la relation entre la sécrétion de OT et la prévention des maladies cardiaques via la différenciation des cellules souches en cellules cardiaques. Cette voie de recherche pourrait permettre de trouver un moyen de contrer les problèmes cardiaques en contrôlant aussi les problèmes d'hypertension ou d'hypertrophie.

6.5. Conclusion

Le traitement de cellules souches embryonnaires P19 avec OT peut induire leur différenciation en cardiomyocytes selon un mécanisme dépendant de OTR et de NO. Les intermédiaires biosynthétiques de OT (OT-X) sont aussi capables d'activité cardiomyogénique. La présence potentielle de OT-X dans le cœur en développement soulève la possibilité d'un rôle important de ces peptides dans la cardiogénèse. L'action cardiomyogénique du DMSO et de l'acide rétinoïque implique aussi le système OT/OTR. Il reste à comprendre la balance des effets négatifs ou positifs de NO dans la cardiomyogénèse ainsi qu'à évaluer l'implication de voies de transduction autres que celles de NO dans l'action cardiomyogénique de OT. Les résultats de cette thèse contribuent à la compréhension des mécanismes du développement cardiaque et pourraient conduire à des applications thérapeutiques importantes.

Chapitre VII

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adameyko II, Mudry RE, Houston-Cummings NR, Veselov AP, Gregorio CC, Tevosian SG. 2005. «Expression and regulation of mouse SERDIN1, a highly conserved cardiac-specific leucine-rich repeat protein». *Dev Dyn.*, vol. 233, no 2, p.540-52.

Adan RA, Cox JJ, van Kats JP, Burbach JP. 1992. «Thyroid hormone regulates the oxytocin gene». *J Biol Chem.*, vol. 267, no 6, p.3771-7.

Alstein M, Whitnall MH, House S, Key S, Gainer H. 1988. «An immunochemical analysis of oxytocin and vasopressin prohormone processing in vivo». *Peptides*, vol. 9, no 1, p.87-105.

Altstein M, Gainer H. 1988. «Differential biosynthesis and posttranslational processing of vasopressin and oxytocin in rat brain during embryonic and postnatal development». *J Neurosci.*, vol. 8, no 11, p.3967-77.

Anderson RG. 2003. «Joe Goldstein and Mike Brown: from cholesterol homeostasis to new paradigms in membrane biology». *Trends Cell Biol.*, vol.13, no 10, p.534-9.

Ando S, Murthy AS, Eipper BA, Chaiken IM. 1988. «Effect of neurophysin on enzymatic maturation of oxytocin from its precursor». *J Biol Chem.*, vol 263, no 2, p.769-75.

Ang VT, Jenkins JS. 1984. «Neurohypophysial hormones in the adrenal medulla». *J Clin Endocrinol Metab.*, vol. 58, no 4, p.688-91.

Argiolas A, Melis MR, Stancampiano R, Mauri A, Gessa GL. 1990. «Hypothalamic modulation of immunoreactive oxytocin in the rat thymus». *Peptides*, vol. 11 no 3, p.539-43.

Arnhold S, Fassbender A, Klinz FJ, Kruttwig K, Lohnig B, Andressen C, Addicks K. 2002. «NOS-II is involved in early differentiation of murine cortical, retinal and ES cell-derived neurons-an immunocytochemical and functional approach». *Int J Dev Neurosci.*, vol. 20, no 2, p.83-92.

- Asai J, Nakazato M, Toshimori H, Matsukura S, Kangawa K, Matsuo H. 1987. «Presence of atrial natriuretic polypeptide in the pulmonary vein and vena cava». *Biochem Biophys Res Commun.*, vol. 146, no 3, p.1465-70.
- Baek, K. J., N. S. Kwon, H., S. Lee, M. S. Kim, P. Muralidhar, M. J. Im. 1996. «Oxytocin receptor couples to the 80 kda Gha family protein in human myometrium». *Biochem. J.*, vol. 315, p.739-744.
- Balligand JL, Cannon PJ. 1997. «Nitric oxide synthases and cardiac muscle. Autocrine and paracrine influences». *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, vol. 17, no 10, p.1846-58.
- Balligand JL, Ungureanu D, Kelly RA, Kobzik L, Pimental D, Michel T, Smith TW. 1993. «Abnormal contractile function due to induction of nitric oxide synthesis in rat cardiac myocytes follows exposure to activated macrophage-conditioned medium». *J Clin Invest.*, vol. 91, no 5, p.2314-9.
- Barcroft H, Talbot JF. 1968. «Oliver and Schafer's discovery of the cardiovascular action of suprarenal extract». *Postgrad Med J.*, vol 44 no 507, p.6-8.
- Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Anversa P. 2003. «Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration». *Cell*, vol. 114, no 6, p.763-76.
- Bers DM. 2002. «Cardiac excitation-contraction coupling». *Nature*, vol. 415, no 6868, p. 198-205.
- Bloch W, Fleischmann BK, Lorke DE, Andressen C, Hops B, Hescheler J, Addicks K. 1999. «Nitric oxide synthase expression and role during cardiomyogenesis». *Cardiovasc Res.*, vol. 43, no 3, p.675-84.
- Blondel O, Vandecasteele G, Gastineau M, Leclerc S, Dahmoune Y, Langlois M, Fischmeister R. 1997. «Molecular and functional characterization of a 5-HT₄ receptor cloned from human atrium». *FEBS Lett.*, vol. 412, no 3, p.465-74.
- Boer PH. 1994. «Activation of the gene for type-b natriuretic factor in mouse stem cell cultures induced for cardiac myogenesis». *Biochem Biophys Res Commun.*, vol. 199, no 2, p.954-61.
- Bolduc D, Cadet N, Sayasith K, Paquin J. 1997. «Proteolytic profile of recombinant pro-opiomelanocortin in embryonal carcinoma P19 cells: conversion to beta-lipotropin and secretion are inhibited following incubation with canavanine». *Biochem Cell Biol.*, vol 75, no 3, p.237-46.

Brostrom MA, Mourad F, Brostrom CO. 2001. «Regulated expression of GRP78 during vasopressin-induced hypertrophy of heart-derived myocytes». *J Cell Biochem.*, vol 83, no 2, p.204-17.

Burbach JP, Schotman P, de Kloet ER. 1980. «Oxytocin biotransformation in the rat limbic brain: chemical characterization of two oxytocin fragments and proposed pathway for oxytocin conversion». *Biochem Biophys Res Commun.*, vol. 97, no 3, p.1005-13.

Burbach JP, van Schaick HS, de Bree FM, Lopes da Silva S, Adan RA. 1995. «Functional domains in the oxytocin gene for regulation of expression and biosynthesis of gene products». *Adv Exp Med Biol.*, vol. 395, p.9-21.

Burghardt RC, Barhoumi R, Sanborn BM, Andersen J. 1999. «Oxytocin-induced Ca²⁺ responses in human myometrial cells». *Biol Reprod.*, vol. 60, no. 4, p.777-82.

Bussolati G, Cassoni P, Ghisolfi G, Negro F, Sapino A. 1996. «Immunolocalization and gene expression of oxytocin receptors in carcinomas and non-neoplastic tissues of the breast». *Am J Pathol.*, vol.148, no. 6, p.1895-903.

Cadet N, Paquin J. 2000. «Conversion and storage of somatostatin are established before response to secretagogue stimuli in P19 neurons». *Brain Res Dev Brain Res.*, vol. 120, no 2, p.211-21.

Cameron VA, Ellmers LJ. 2003. «Minireview: natriuretic peptides during development of the fetal heart and circulation», *Endocrinology.*, vol. 144, no 6, p:2191-4.

Cantin M, Genest J. 1988. «The heart as an endocrine gland». *Pharmacol Res Commun.*, vol. 20, p.1-22.

Carter CS. 2003. «Developmental consequences of oxytocin». *Physiol Behav.*, vol. 79, no 3, p.383-97.

Cassoni P, Marrocco T, Deaglio S, Sapino A, Bussolati G. 2001. «Biological relevance of oxytocin and oxytocin receptors in cancer cells and primary tumors». *Ann Oncol.*, Vol.12, p.S37-9.

Cassoni P, Sapino A, Marrocco T, Chini B, Bussolati G. 2004. «Oxytocin and oxytocin receptors in cancer cells and proliferation». *J Neuroendocrinol.*, vol. 16, no 4, p.362-4.

Chao DS, Silvagno F, Bredt DS. 1998. «Muscular dystrophy in mdx mice despite lack of neuronal nitric oxide synthase». *J Neurochem.*, vol. 71, no 2, p.784-9.

- Chen Q, Schreiber SS, Brinton RD. 2000. «Vasopressin and oxytocin receptor mRNA expression during rat telencephalon development». *Neuropeptides*, vol. 34 no 3, p.173-80.
- Choi SC, Yoon J, Shim WJ, Ro YM, Lim DS. 2004. «5-azacytidine induces cardiac differentiation of P19 embryonic stem cells». *Exp Mol Med.*, vol. 36, no 6, p.515-23.
- Ciosek J, Drobnik J. 2004. «Vasopressin and oxytocin release and the thyroid function». *J Physiol Pharmacol.*, vol. 55, no 2, p.423-41.
- Contestabile A, Ciani E. 2004. «Role of nitric oxide in the regulation of neuronal proliferation, survival and differentiation». *Neurochem Int.*, vol. 45, no 6, p.903-14.
- Dale HH (1906) «On some physiological actions of ergot. *J Physiol (Lond)*» vol. 34, p.163-206.
- Damy T, Ratajczak P, Shah AM, Camors E, Marty I, Hasenfuss G, Marotte F, Samuel JL, Heymes C. 2004. «Increased neuronal nitric oxide synthase-derived NO production in the failing human heart». *Lancet*, vol. 363, no 9418, p.1365-7.
- De Bold AJ, Borenstein HB, Veress AT, Sonnenberg H. 1981. «A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats». *Life Sci.*, vol. 28, p.89-94,
- De Geest K, Thiery M, Piron-Possuyt G, Vanden Driessche R. 1985. «Plasma oxytocin in human pregnancy and parturition». *J Perinat Med.*, vol. 13 no 1, p.3-13.
- den Hertog CE, de Groot AN, van Dongen PW. 2001. «History and use of oxytocics». *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.*, vol 94, no 1, p.8-12.
- Devost D, Girotti M, Carrier ME, Russo C, Zingg HH. 2005. «Oxytocin induces dephosphorylation of eukaryotic elongation factor 2 in human myometrial cells». *Endocrinology*, vol.146, no 5, p.2265-70.
- Dogterom J, Van Wimersma Greidanus TB, Swabb DF. 1977. «Evidence for the release of vasopressin and oxytocin into cerebrospinal fluid: measurements in plasma and CSF of intact and hypophysectomized rats». *Neuroendocrinology*, vol. 24, no 2, p.108-18.
- Drab M, Verkade P, Elger M, Kasper M, Lohn M, Lauterbach B, Menne J, Lindschau C, Mende F, Luft FC, Schedl A, Haller H, Kurzchalia TV. 2001. «Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice». *Science.*, vol. 293, no 5539, p.2449-52.

du Vigneaud V, Ressler C, Trippett S. 1953. «The sequence of amino acids in oxytocin, with a proposal for the structure of oxytocin». *J Biol Chem.*, vol. 205, no 2, p.949-57.

Dulhunty AF, Haarmann CS, Green D, Laver DR, Board PG, Casarotto MG. 2002. «Interactions between dihydropyridine receptors and ryanodine receptors in striated muscle». *Prog Biophys Mol Biol.*, vol. 79, no 1, p.45-75.

Edwards MK, McBurney MW. 1983. «The concentration of retinoic acid determines the differentiated cell types formed by a teratocarcinoma cell line». *Dev Biol.*, vol. 98, no 1, p.187-91.

Fabian E, Havranek F, Stork A, Sponarova J. 1969. «Changes of some indicators of lipid metabolism following short term administration of biogest to fertile non-pregnant women and in the 1st trimester of pregnancy». *Cas Lek Cesk.*, vol. 108 no 49, p.1466-9.

Favaretto AL, Ballejo GO, Albuquerque-Araujo WI, Gutkowska J, Antunes-Rodrigues J, McCann SM. 1997. «Oxytocin releases atrial natriuretic peptide from rat atria in vitro that exerts negative inotropic and chronotropic action». *Peptides*, vol. 18 no 9, p.1377-81.

Feng Q, Song W, Lu X, Hamilton JA, Lei M, Peng T, Yee SP. 2002. «Development of heart failure and congenital septal defects in mice lacking endothelial nitric oxide synthase». *Circulation.*, vol. 106, no 7, p.873-9.

Fuchs AR, Fuchs F, Husslein P, Soloff MS. 1984. «Oxytocin receptors in the human uterus during pregnancy and parturition». *Am J Obstet Gynecol.*, Vol. 150 no 6 p.734-41.

Furuya K, Mizumoto Y, Makimura N, Mitsui C, Murakami M, Tokuoka S, Ishikawa, N, Nagata I, Kimura T, Ivell R. 1995 «A novel biological aspect of ovarian oxytocin: gene expression of oxytocin and oxytocin receptor in cumulus/luteal cells and the effect of oxytocin on embryogenesis in fertilized oocytes». *Adv Exp Med Biol.*, vol. 395, p.523-8.

Gao L, Yu LC. 2004. «Involvement of opioid receptors in the oxytocin-induced antinociception in the central nervous system of rats». *Regul Pept.*, vol. 120, no 1, p.53-8.

Gardner DG, Deschepper CF, Baxter JD. 1987. «The gene for the atrial natriuretic factor is expressed in the aortic arch». *Hypertension*. vol. 9, no 1, p.103-6.

Gauquelin G, Gharib C, Ghaemmaghani F, Allevard AM, Cherbal F, Geelen G, Bouzeghrane F, Legros JJ. 1988. «A day/night rhythm of vasopressin and oxytocin in rat retina, pineal and hardierian gland». *Peptides*, vol. 9 no 2, p.289-93.

Gauthier C, Leblais V, Kobzik L, Trochu JN, Khandoudi N, Bril A, Balligand JL, Le Marec H. 1998. «The negative inotropic effect of beta3-adrenoceptor stimulation is mediated by activation of a nitric oxide synthase pathway in human ventricle». *J Clin Invest.*, vol. 102, no 7, p.1377-84.

Gimpl G, Fahrenholz F. 2001. «The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation». *Physiol Rev.*, vol 81, no 2 p.629-83.

Gimpl G, Wiegand V, Burger K, Fahrenholz F. 2002. «Cholesterol and steroid hormones: modulators of oxytocin receptor function». *Prog Brain Res.*, vol. 139, p.43-55.

Girard B, Ouafik L, Boudouresque F. 1999. «Characterization and regulation of peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase (PAM) expression in H9c2 cardiac myoblasts». *Cell Tissue Res.*, vol. 298, no 3, p.489-97.

Goette A, Jentsch-Ullrich K, Lendeckel U, Rocken C, Agbaria M, Auricchio A, Mohren M, Franke A, Klein HU. 2003. «Effect of atrial fibrillation on hematopoietic progenitor cells: a novel pathophysiological role of the atrial natriuretic peptide? ». *Circulation*, vol. 108, no 20, p.2446-9.

Goldenthal MJ, Marin-Garcia J. 2003. «Stem cells and cardiac disorders: an appraisal». *Cardiovasc Res.*, vol. 58, no 2, p.369-77.

Gosselin R, Gutkowska J, Baribeau J, Perreault T. 1997. «Endothelin receptor changes in hypoxia-induced pulmonary hypertension in the newborn piglet». *Am J Physiol.*, vol. 273, p.L72-9.

Grepin C, Nemer G, Nemer M. 1997. «Enhanced cardiogenesis in embryonic stem cells overexpressing the GATA-4 transcription factor». *Development*, vol. 124, no 12, p.2387-95.

Gulmezoglu AM, Forna F, Villar J, Hofmeyr GJ. 2004. «Prostaglandins for prevention of postpartum haemorrhage». *Cochrane Database Syst Rev.*, vol. 1, p.CD000494.

Gulmezoglu AM, Villar J, Ngoc NT, Piaggio G, Carroli G, Adetoro L, Abdel-Aleem H, Cheng L, Hofmeyr G, Lumbiganon P, Unger C, Prendiville W, Pinol A, Elbourne D, El-Refaey H, Schulz K. 2001. «WHO Collaborative Group To Evaluate Misoprostol in the Management of the Third Stage of Labour. WHO multicentre randomised trial of misoprostol in the management of the third stage of labour». *Lancet*, Vol. 358 no 9283, p.689-95.

Gutkowska J, Jankowski M, Lambert C, Mukaddam-Daher S, Zingg HH, McCann SM. 1997. «Oxytocin releases atrial natriuretic peptide by combining with oxytocin receptors in the heart». *Proc Natl Acad Sci U S A.*, vol. 94 no 21, p.11704-9.

Gutkowska J, Nemer M. 1989. «Structure, expression, and function of atrial natriuretic factor in extraatrial tissues». *Endocr Rev.*, vol. 10, no 4, p.519-36.

Habara-Ohkubo A. 1996. «Differentiation of beating cardiac muscle cells from a derivative of P19 embryonal carcinoma cells». *Cell Struct Funct.*, vol. 21, no 2, p.101-10.

Hansenne I, Rasier G, Pequeux C, Brilot F, Renard Ch, Breton C, Greimers R, Legros JJ, Geenen V, Martens HJ. 2005. «Ontogenesis and functional aspects of oxytocin and vasopressin gene expression in the thymus network». *J Neuroimmunol.*, vol. 158, no 1, p.67-75.

Heng BC, Haider HKh, Sim EK, Cao T, Ng SC. 2004. «Strategies for directing the differentiation of stem cells into the cardiomyogenic lineage in vitro». *Cardiovasc Res.*, vol. 62, no 1, p.34-42.

Hinko A, Soloff MS, Potier M. 1992. «Molecular size characterization of oxytocin receptors in rabbit amnion». *Endocrinology*, vol.130, no 6, p.3554-9.

Holmes CL, Landry DW, Granton JT. 2003. «Science review: Vasopressin and the cardiovascular system part 1- receptor physiology». *Crit Care.*, vol. 7, no 6, p.427-34.

Holmes CL, Landry DW, Granton JT. 2004. «Science Review: Vasopressin and the cardiovascular system part 2 – clinical physiology». *Crit Care.*, vol. 8, no 1, p.15-23.

Hope DB, Murti VV, Du Vigneaud V.1962. «A highly potent analogue of oxytocin, desamino-oxytocin». *J Biol Chem.*, vol. 237, p.1563-6.

Howell WH, 1898 «The Influence of high arterial pressures upon the blood-flow through the brain». *Am J Physiol* vol1 p:57-70.

Hupf H, Grimm D, Riegger GA, Schunkert H. 1999. «Evidence for a vasopressin system in the rat heart». *Circ Res.*, vol. 84, no 3, p.365-70.

Ignarro LJ. 1990. «Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide». *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, vol. 30, p.535-60.

Jankowski M, Hajjar F, Kawas SA, Mukaddam-Daher S, Hoffman G, McCann SM, Gutkowska J. 1998. «Rat heart: a site of oxytocin production and action». *Proc Natl Acad Sci U S A.*, vol. 95, no 24, p.14558-63.

Jankowski M, Danalache B, Wang D, Bhat P, Hajjar F, Marcinkiewicz M, Paquin J, McCann SM, Gutkowska J. 2004. «Oxytocin in cardiac ontogeny». *Proc Natl Acad Sci U S A.*, vol.101, no35, p.13074-9.

Jeannotte R, Paquin J, Petit-Turcotte C, Day R. 1997. «Convertase PC2 and the neuroendocrine polypeptide 7B2 are co-induced and processed during neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells». *DNA Cell Biol.*, vol. 16, no 10, p.1175-87.

Kajstura J, Leri A, Finato N, Di Loreto C, Beltrami CA, Anversa P. 1998. «Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans». *Proc Natl Acad Sci U S A.*, vol. 95, no 15, p.8801-5.

Kamm O, Aldrich TB, Grote IW, Rowe LW, and Bugbee EP, 1928. *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 50, p.573.

Kanno S, Kim PK, Sallam K, Lei J, Billiar TR, Shears LL 2nd. 2004. «Nitric oxide facilitates cardiomyogenesis in mouse embryonic stem cells». *Proc Natl Acad Sci U S A.*, vol. 101, no 33, p.12277-81.

Kawakami Y, Raya A, Raya RM, Rodriguez-Esteban C, Belmonte JC. 2005. «Retinoic acid signalling links left-right asymmetric patterning and bilaterally symmetric somitogenesis in the zebrafish embryo». *Nature*, vol. 435, no 7039, p.165-71.

Keller SR. 2004. «Role of the insulin-regulated aminopeptidase IRAP in insulin action and diabetes». *Biol Pharm Bull.*, vol. 27, no 6, p.761-4.

Klimek R. 2001. «Oxytocinase as the most important marker of fetal development». *Early Pregnancy.*, vol. 5, no 1, p.38-9.

Knapp PE, Itkis OS, Zhang L, Spruce BA, Bakalkin G, Hauser KF. 2001. «Endogenous opioids and oligodendroglial function: possible autocrine/paracrine effects on cell survival and development». *Glia*, vol. 35, no 2, p.156-65.

Kobayashi H, Nomura S, Mitsui T, Ito T, Kuno N, Ohno Y, Kadomatsu K, Muramatsu T, Nagasaka T, Mizutani S. 2004. «Tissue distribution of placental leucine aminopeptidase/oxytocinase during mouse pregnancy». *J Histochem Cytochem.*, vol. 52, no 1, p.113-21.

Kombian SB, Hirasawa M, Mougnot D, Pittman QJ. 2002. «Modulation of synaptic transmission by oxytocin and vasopressin in the supraoptic nucleus». *Prog Brain Res.*, vol. 139, p.235-46.

Kosfeld M, Heinrichs M, Zak PJ, Fischbacher U, Fehr E. 2005. «Oxytocin increases trust in humans». *Nature*, vol. 435, no 7042, p.673-6.

Kubota Y, Kimura T, Hashimoto K, Tokugawa Y, Nobunaga K, Azuma C, Saji F, Murata Y. 1996. «Structure and expression of the mouse oxytocin receptor gene». *Mol Cell Endocrinol.*, vol. 124, no 1, p.25-32.

Kukucka MA, Misra HP. 1992. «HPLC determination of an oxytocin-like peptide produced by isolated guinea pig Leydig cells: stimulation by ascorbate». *Arch Androl.*, vol. 29, no 2, p.185-90.

Lagumdzija A, Pernow Y, Bucht E, Gonon A, Petersson M. 2005. «The effects of arg-vasopressin on osteoblast-like cells in endothelial nitric oxide synthase-knockout mice and their wild type counterparts». *Peptides*, vol. 26, no 9, p.1661-6.

Lai L, Bohnsack BL, Niederreither K, Hirschi KK. 2003. «Retinoic acid regulates endothelial cell proliferation during vasculogenesis». *Development*, vol. 130, no 26, p.6465-74.

Lammer EJ, Chen DT, Hoar RM, Agnish ND, Benke PJ, Braun JT, Curry CJ, Fernhoff PM, Grix AW Jr, Lott IT, et al. 1985. «Retinoic acid embryopathy». *N Engl J Med.*, vol. 313, no 14, p.837-41.

Laplante I, Beliveau R, Paquin J. 2004. «RhoA/ROCK and Cdc42 regulate cell-cell contact and N-cadherin protein level during neurodetermination of P19 embryonal stem cells». *J Neurobiol.*, vol. 60, no 3, p.289-307.

Larsen TH. 1988. «Immunocytochemical localization of atrial natriuretic peptide in the venae cavae and the pulmonary veins of the rat». *Histochem J.*, vol. 20, no 2, p.69-74.

Lechner M, Lirk P, Rieder J. 2005. «Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in tumor biology: the two sides of the same coin». *Semin Cancer Biol.*, vol.15, no 4, p.277-89.

Lefebvre DL, Giaid A, Bennett H, Lariviere R, Zingg HH. 1992. «Oxytocin gene expression in rat uterus». *Science*, vol. 256, no 5063, p.1553-5.

Lefebvre DL, Giaid A, Zingg HH. 1992. «Expression of the oxytocin gene in rat placenta». *Endocrinology*, vol. 130, no 3, p.1185-92.

Lev S, Kehat I, Gepstein L. 2005. «Differentiation pathways in human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes». *Ann N Y Acad Sci.*, vol. 1047, p.50-65.

Liu W, Pappas GD, Carter CS. 2005. «Oxytocin receptors in brain cortical regions are reduced in haploinsufficient (+/-) reeler mice». *Neurol Res.*, vol. 27, no 4, p.339-45.

Llorens S, Salazar FJ, Nava E. 2005. «Assessment of the nitric oxide system in the heart, aorta and kidney of aged Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats». *J Hypertens.*, vol. 23, no 8, p.1507-14.

Lowenstein CJ, Alley EW, Raval P, Snowman AM, Snyder SH, Russell SW, Murphy WJ. 1993. «Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon gamma and lipopolysaccharide». *Proc Natl Acad Sci U S A.*, vol. 90, no 20, p.9730-4.

Lowey S, Slayter HS, Weeds AG, Baker H. 1969. «Substructure of the myosin molecule. I. Subfragments of myosin by enzymic degradation». *J Mol Biol.*, vol. 42, no 1, p.1-29.

Malan D, Ji GJ, Schmidt A, Addicks K, Hescheler J, Levi RC, Bloch W, Fleischmann BK. 2004. «Nitric oxide, a key signaling molecule in the murine early embryonic heart». *FASEB J.*, vol. 18, no 10, p.1108-10.

Malek A, Blann E, Mattison DR. 1996. «Human placental transport of oxytocin». *J Matern Fetal Med.*, vol. 5 no 5, p.245-55.

Marani E, van Oers JW, Tetteroo PA, Poelmann RE, van der Veecken J, Deenen MG. 1986. «Stage specific embryonic carbohydrate surface antigens of primordial germ cells in mouse embryos: FAL (S.S.E.A.-1) and globoside (S.S.E.A.-3)». *Acta Morphol Neerl Scand.*, vol. 24, no 2, p.103-10.

Mashimo H, Goyal RK. 1999. «Lessons from genetically engineered animal models. IV. Nitric oxide synthase gene knockout mice». *Am J Physiol.*, vol. 277, no 4, p.G745-50.

Mashimo H, Kjellin A, Goyal RK. 2000. «Gastric stasis in neuronal nitric oxide synthase-deficient knockout mice». *Gastroenterology*, vol. 119, no 3, p.766-73.

Massion PB, Balligand JL. 2003. «Modulation of cardiac contraction, relaxation and rate by the endothelial nitric oxide synthase (eNOS): lessons from genetically modified mice». *J Physiol.*, vol. 546, no 1, p. 63-75.

Massion PB, Pelat M, Belge C, Balligand JL. 2005. «Regulation of the mammalian heart function by nitric oxide». *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.*, vol. 142, no 2, p.144-50.

Matsumoto H, Nagasaka T, Hattori A, Rogi T, Tsuruoka N, Mizutani S, Tsujimoto M. 2001. «Expression of placental leucine aminopeptidase /oxytocinase in neuronal cells and its action on neuronal peptides». *Eur J Biochem.*, vol. 268, no 11, p.3259-66.

Matsuura K, Nagai T, Nishigaki N, Oyama T, Nishi J, Wada H, Sano M, Toko H, Akazawa H, Sato T, Nakaya H, Kasanuki H, Komuro I. 2004. «Adult cardiac Sca-1-positive cells differentiate into beating cardiomyocytes». *J Biol Chem.*, vol. 279, no 12, p.11384-91.

McBurney MW. 1993. «P19 embryonal carcinoma cells». *Int J Dev Biol.*, vol. 37, no 1, p.135-40.

Mejia-Alvarez R, Manno C, Villalba-Galea CA, del Valle Fernandez L, Costa RR, Fill M, Gharbi T, Escobar AL. 2003. «Pulsed local-field fluorescence microscopy: a new approach for measuring cellular signals in the beating heart». *Pflugers Arch.*, vol. 445, no 6, no 747-58.

Mena F, Pacheco P, Aguayo D, Clapp C, Grosvenor CE. 1978. «A rise in intramammary pressure follows electrical stimulation of mammary nerve in anesthetized rats». *Endocrinology*, vol. 103 no 5, p.1929-36.

Mery PF, Hove-Madsen L, Chesnais JM, Hartzell HC, Fischmeister R. 1996. «Nitric oxide synthase does not participate in negative inotropic effect of acetylcholine in frog heart». *Am J Physiol.*, vol. 270, no 4, p.H1178-88.

Michelini LC, Marcelo MC, Amico J, Morris M. 2003. «Oxytocinergic regulation of cardiovascular function: studies in oxytocin-deficient mice». *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, vol. 284 no 6, p.H2269-76.

Mitchell BF, Fang X, Wong S. 1998. «Oxytocin: a paracrine hormone in the regulation of parturition? » *Rev Reprod.*, vol 3, no 2, p.113-22.

Mitchell BF, Fang X, Wong S. 1998. «Role of carboxy-extended forms of oxytocin in the rat uterus in the process of parturition». *Biol Reprod.*, vol. 59, no 6, p.1321-7.

Mitsui T, Nomura S, Itakura A, Mizutani S. 2004. «Role of aminopeptidases in the blood pressure regulation». *Biol Pharm Bull.*, vol. 27, no 6, p.768-71.

Molkentin JD, Kalvakolanu DV, Markham BE. 1994. «Transcription factor GATA-4 regulates cardiac muscle-specific expression of the alpha-myosin heavy-chain gene». *Mol Cell Biol.*, vol. 14, no 7, p.4947-57.

Moore JC, Spijker R, Martens AC, de Boer T, Rook MB, van der Heyden MA, Tertoolen LG, Mummery CL. 2004. «A P19Cl6 GFP reporter line to quantify cardiomyocyte differentiation of stem cells». *Int J Dev Biol.*, vol. 48, no 1, p.47-55.

Moore JC, Spijker R, Martens AC, de Boer T, Rook MB, van der Heyden MA, Tertoolen LG, Mummery CL. 2004. «A P19Cl6 GFP reporter line to quantify cardiomyocyte differentiation of stem cells». *Int J Dev Biol.*, vol. 48, no 1, p.47-55.

Morley P, Whitfield JF. 1993. «The differentiation inducer, dimethyl sulfoxide, transiently increases the intracellular calcium ion concentration in various cell types». *J Cell Physiol.*, vol. 156, no 2, p.219-25.

Morris M, Castro M, Rose JC. 1992. «Alterations in oxytocin prohormone processing during early development in the fetal sheep». *Am J Physiol.*, vol. 263, no 3, p.R738-40.

Mukaddam-Daher S, Yin YL, Roy J, Gutkowska J, Cardinal R. 2001. «Negative inotropic and chronotropic effects of oxytocin». *Hypertension*, vol. 38, no 2, p.292-6.

Naito AT, Tominaga A, Oyamada M, Oyamada Y, Shiraishi I, Monzen K, Komuro I, Takamatsu T. 2003. «Early stage-specific inhibitions of cardiomyocyte differentiation and expression of Csx/Nkx-2.5 and GATA-4 by phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor LY294002». *Exp Cell Res.*, vol. 291, no 1, p.56-69.

Nakamura T, Sano M, Songyang Z, Schneider MD. 2003. «A Wnt- and beta -catenin-dependent pathway for mammalian cardiac myogenesis». *Proc Natl Acad Sci U S A.*, vol. 100, no 10, p.5834-9.

Niederreither K, Vermot J, Messaddeq N, Schuhbaur B, Chambon P, Dolle P. 2001. «Embryonic retinoic acid synthesis is essential for heart morphogenesis in the mouse». *Development*, vol. 128, no 7, p.1019-31.

Nishimori K, Matzuk MM. 1996. «Transgenic mice in the analysis of reproductive development and function». *Rev Reprod.*, vol. 1, no 3, p.203-12.

Novak JF, Judkins MB, Chernin MI, Cassoni P, Bussolati G, Niche JA, Nishimoto SK. 2000. «A plasmin-derived hexapeptide from the carboxyl end of osteocalcin counteracts oxytocin-mediated growth inhibition of osteosarcoma cells». *Cancer Res.*, vol. 60, no 13, p.3470-6. *Erratum: Cancer Res.*, vol. 60, no 16, p.4663.

Ohlsson B, Rehfeld JF, Forsling ML. 2004. «Oxytocin and cholecystokinin secretion in women with colectomy». *BMC Gastroenterol.*, no 4, p.25.

Ohlsson B, Ringstrom G, Abrahamsson H, Simren M, Bjornsson ES. 2004. «Oxytocin stimulates colonic motor activity in healthy women». *Neurogastroenterol Motil.*, vol. 16, no 2, p.233-40.

Ott I and Scott JC, 1910. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, vol. 8 p.48.

Paquin J, Danalache BA, Jankowski M, McCann SM, Gutkowska J. 2002. Oxytocin induces differentiation of P19 embryonic stem cells to cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, vol. 99, no 14, p.9550-5.

Pelat M, Massion PB, Balligand JL. 2005. «Nitric oxide "at heart": emerging paradigms after a decade». *Arch Mal Coeur Vaiss.*, vol. 98, no 3, p.242-8.

Perreault T, Gutkowska J. 1995. «Role of atrial natriuretic factor in lung physiology and pathology». *Am J Respir Crit Care Med.*, vol. 151, no 1, p.226-42.

Petersson M, Lagumdzija A, Stark A, Bucht E. 2002. «Oxytocin stimulates proliferation of human osteoblast-like cells». *Peptides*, vol. 23, no 6, p.1121-6.

Petersson M, Uvnas-Moberg K. 2004. «Prolyl-leucyl-glycinamide shares some effects with oxytocin but decreases oxytocin levels». *Physiol Behav.*, vol. 83, no 3, p.475-81.

Petersson M. 2002. «Oxytocin decreases plasma levels of thyroid-stimulating hormone and thyroid hormones in rats». *Regul Pept.*, vol. 108, no 2, p.83-7.

Petit-Turcotte C, Paquin J. 2000. «Coordinate regulation of neuroendocrine convertase PC2 and peptide 7B2 in P19 neurons». *Peptides*, vol. 21, no 3, p.365-72.

Pierce JG, Gordon S, and Du Vigneaud V, 1952 *J. Biol. Chem.*, vol.199 p. 929.

Phaneuf S, Carrasco MP, Europe-Finner GN, Hamilton CH, Lopez Bernal A. 1996. «Multiple G proteins and phospholipase C isoforms in human myometrial cells: implication for oxytocin action». *J Clin Endocrinol Metab.*, vol. 81, no 6, p.2098-103.

Phung YT, Bekker JM, Hallmark OG, Black SM. 1999. «Both neuronal NO synthase and nitric oxide are required for PC12 cell differentiation: a cGMP independent pathway». *Brain Res Mol Brain Res.*, vol. 64, no 2, p.165-78.

Plecas B, Popovic A, Jovovic D, Hristic M. 1992. «Mitotic activity and cell deletion in ventral prostate epithelium of intact and castrated oxytocin-treated rats». *J Endocrinol Invest.*, vol.15, no 4, p.249-53.

Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. 1987. «The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium». *Biochem Biophys Res Commun.*, vol. 148, no 3, p.1482-9.

Reversi A, Rimoldi V, Marrocco T, Cassoni P, Bussolati G, Parenti M, Chini B. 2005. «The oxytocin receptor antagonist atosiban inhibits cell growth via a "biased agonist" mechanism». *J Biol Chem.*, vol. 280, no 16, p.16311-8.

Rimoldi V, Reversi A, Taverna E, Rosa P, Francolini M, Cassoni P, Parenti M, Chini B. 2003. «Oxytocin receptor elicits different EGFR/MAPK activation patterns depending on its localization in caveolin-1 enriched domains». *Oncogene.*, vol. 22, no 38, p.6054-60.

Rodriguez ER, Tan CD, Onwuta US, Yu ZX, Ferrans VJ, Parrillo JE. 1994. «3,5,3'-Triiodo-L-thyronine induces cardiac myocyte differentiation but not neuronal differentiation in P19 teratocarcinoma cells in a dose dependent manner». *Biochem Biophys Res Commun.*, vol. 205, no 1, p.652-8.

Rudnicki, M., McBurney, M.W. 1987. «Cell culture methods and induction of differentiation of embryonal carcinoma cell lines. Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach». E.J. Robertson. Ed. (IRL Press, Oxford, England), p.19-49.

Sano M, Itakura A, Ito M, Takeuchi M, Okada M, Kotani T, Mizutani S, Kikkawa F. 2005. «Placental leucine aminopeptidase might regulate the effects of oxytocin with resolution in endothelial cells». *Med Sci Monit.*, vol. 11, no 7, p.BR195-9.

Sausville E, Carney D, Battey J. 1985. «The human vasopressin gene is linked to the oxytocin gene and is selectively expressed in a cultured lung cancer cell line». *J Biol Chem.*, vol. 260, no 18, p.10236-41.

Shindo T, Ikeda U, Ohkawa F, Kawahara Y, Yokoyama M, Shimada K. 1995. «Nitric oxide synthesis in cardiac myocytes and fibroblasts by inflammatory cytokines». *Cardiovasc Res.*, vol 29, p.813-819.

Shinozuka N, Yen A, Nathanielsz PW. 2000. «Increased myometrial contracture frequency at 96-140 days accelerates fetal cardiovascular maturation». *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, vol. 278, no 1, p.H41-9.

Shuster SJ, Riedl M, Li X, Vulchanova L, Elde R. 2000. «The kappa opioid receptor and dynorphin co-localize in vasopressin magnocellular neurosecretory neurons in guinea-pig hypothalamus». *Neuroscience*, vol. 96, no 2, p.373-83.

Singla DK, Sobel BE. 2005. «Enhancement by growth factors of cardiac myocyte differentiation from embryonic stem cells: a promising foundation for cardiac regeneration». *Biochem Biophys Res Commun.*, vol. 335, no 3, p.637-42.

Skerjanc IS, Petropoulos H, Ridgeway AG, Wilton S. 1998. «Myocyte enhancer factor 2C and Nkx2-5 up-regulate each other's expression and initiate cardiomyogenesis in P19 cells». *J Biol Chem.*, vol. 273, no 52, p.34904-10.

Smith MJ, Wise PM. 2001. «Localization of kappa opioid receptors in oxytocin magnocellular neurons in the paraventricular and supraoptic nuclei». *Brain Res.*, vol. 898, no 1, p.162-5.

Sola C, Thibault G, Haile-Meskel H, Anand-Srivastava MB, Garcia R, Cantin M. 1990. «Atrial natriuretic factor in the vena cava and sinus node». *J Histochem Cytochem.*, vol. 38, no 8, p.1123-35.

Solter D, Knowles BB. 1978. «Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1)». *Proc Natl Acad Sci U S A.*, vol. 75, no 11, p.5565-9.

Sperelakis N, Inoue Y, Ohya Y.1992. «Fast Na⁺ channels and slow Ca²⁺ current in smooth muscle from pregnant rat uterus». *Mol Cell Biochem.*, vol. 114, no 1, p.79-89.

Springall DR, Bhatnagar M, Wharton J, Hamid Q, Gulbenkian S, Hedges M, Meleagros L, Bloom SR, Polak JM. 1988. «Expression of the atrial natriuretic peptide gene in the cardiac muscle of rat extrapulmonary and intrapulmonary veins». *Thorax.*, vol. 43, no 1, p.44-52.

Stiene-Martin A, Knapp PE, Martin K, Gurwell JA, Ryan S, Thornton SR, Smith FL, Hauser KF. 2001. «Opioid system diversity in developing neurons, astroglia, and oligodendroglia in the subventricular zone and striatum: impact on gliogenesis in vivo». *Glia*, vol. 36, no 1, p.78-88.

Tahara A, Tsukada J, Tomura Y, Wada K, Kusayama T, Ishii N, Yatsu T, Uchida, W, Tanaka A. 2000. «Pharmacologic characterization of the oxytocin receptor in human uterine smooth muscle cells». *Br J Pharmacol.*, vol. 129, no 1, p.131-9.

Takahashi T, Lord B, Schulze PC, Fryer RM, Sarang SS, Gullans SR, Lee RT.2003. «Ascorbic acid enhances differentiation of embryonic stem cells into cardiac myocytes». *Circulation*, vol. 107, no 14, p.1912-6.

Tanaka K. 2002. «Natriuretic peptides as novel growth factor of growth plate cartilage» *Clin Calcium.*, vol. 12, no 3, p.352-5.

Taylor AH, Ang VT, Jenkins JS, Silverlight JJ, Coombes RC, Luqmani YA. 1990. «Interaction of vasopressin and oxytocin with human breast carcinoma cells». *Cancer Res.*, vol. 50, no 24, p.7882-6.

Tetteroo F, De Bruijn AY, Henselmans R, Wolkers WF, Van Aelst AC, Hoekstra FA. 1996. «Characterization of Membrane Properties in Desiccation-Tolerant and -Intolerant Carrot Somatic Embryos». *Plant Physiol.*, vol. 111, no 2, p.403-412.

Thibault G, Lazure C, Chretien M, Cantin M. 1989. «Molecular heterogeneity of pro-atrial natriuretic factor». *J Biol Chem.*, vol. 264, no 31, p.18796-802.

Thibonnier M, Conarty DM, Preston JA, Plesnicher CL, Dweik RA, Erzurum SC. 1999. «Human vascular endothelial cells express oxytocin receptors». *Endocrinology*, vol. 140, no 3, p.1301-9.

Thibonnier M, Conarty DM, Preston JA, Wilkins PL, Berti-Mattera LN, Mattera R. 1998. «Molecular pharmacology of human vasopressin receptors». *Adv Exp Med Biol.*, vol. 449, p.251-76.

Toshimori H, Toshimori K, Matsukura S, Oura C, Matsuo H. 1988. «Atrial-specific granules in the hearts of normal and water-deprived rats». *Cell Tissue Res.*, vol. 253, no 3, p.547-52.

Tsujimoto M, Hattori A. 2005. «The oxytocinase subfamily of M1 aminopeptidases». *Biochim Biophys Acta.*, vol. 1751, no 1, p.9-18.

Tsujimoto M, Mizutani S, Adachi H, Kimura M, Nakazato H, Tomoda Y. 1992. «Identification of human placental leucine aminopeptidase as oxytocinase». *Arch Biochem Biophys.*, vol. 292, no 2, p.388-92.

Urbanek K, Quaini F, Tasca G, Torella D, Castaldo C, Nadal-Ginard B, Leri A, Kajstura J, Quaini E, Anversa P. 2003. «Intense myocyte formation from cardiac stem cells in human cardiac hypertrophy». *Proc Natl Acad Sci U S A.*, vol. 100, no 18, p.10440-5.

Van der Heyden MA, Defize LH. 2003. «Twenty one years of P19 cells: what an embryonal carcinoma cell line taught us about cardiomyocyte differentiation». *Cardiovasc Res.*, vol. 58, no 2, p.292-302.

Van der Heyden MA, van Kempen MJ, Tsuji Y, Rook MB, Jongsma HJ, Opthof T. 2003. «P19 embryonal carcinoma cells: a suitable model system for cardiac electrophysiological differentiation at the molecular and functional level». *Cardiovasc Res.*, vol. 58, no 2, p.410-22.

Van Tol HH, van den Buuse M, de Jong W, Burbach JP. 1988. «Vasopressin and oxytocin gene expression in the supraoptic and paraventricular nucleus of the spontaneously hypertensive rat (SHR) during development of hypertension». *Brain Res.*, vol. 464, no 4, p.303-11.

Vandecasteele G, Eschenhagen T, Fischmeister R. 1998. «Role of the NO-cGMP pathway in the muscarinic regulation of the L-type Ca^{2+} current in human atrial myocytes». *J Physiol.*, vol. 506, no 3, p.653-63.

Ventura C, Maioli M. 2000. «Opioid peptide gene expression primes cardiogenesis in embryonal pluripotent stem cells». *Circ Res.*, vol. 87, no 3, p.189-94.

Ventura C, Zinellu E, Maninchedda E, Maioli M. 2003. «Dynorphin B is an agonist of nuclear opioid receptors coupling nuclear protein kinase C activation to the transcription of cardiogenic genes in GTR1 embryonic stem cells». *Circ Res.*, vol. 92, no 6, p.623-9

Verbalis JG. 1999. «The brain oxytocin receptor(s)?». *Front Neuroendocrinol.*, vol. 20, no 2, p.146-56.

Vignozzi L, Vannelli GB, Morelli A, Mancina R, Marini M, Ferruzzi P, Crescioli C, Luconi M, Donati S, Fisher AD, Baldi E, Filippi S, Forti G, Maggi M. 2005. «Identification, characterization and biological activity of oxytocin receptor in the developing human penis». *Mol Hum Reprod.*, vol. 11, no 2, p.99-106.

Von den Velden R, 1913. *Klin. Wochschr.*, vol. 50, p. 2083.

Wagner KU, Young WS 3rd, Liu X, Ginns EI, Li M, Furth PA, Hennighausen L. 1997. «Oxytocin and milk removal are required for post-partum mammary-gland development». *Genes Funct.*, vol. 1, no 4, p. 233-44.

Welbourn RB, 1992 «The emergence of endocrinology». *Gesnerus.*, vol. 49, no 2, p:137-50.

Wentlandt K, Carlen PL, Kushnir M, Naus CC, El-Beheiry H. 2005. «General anesthetics attenuate gap junction coupling in P19 cell line». *J Neurosci Res.*, vol. 81, no 5, p.746-52.

Wentlandt K, Kushnir M, Naus CC, Carlen PL. 2004. «Ethanol inhibits gap-junctional coupling between P19 cells». *Alcohol Clin Exp Res.*, vol. 28, no 9, p.1284-90.

Winslow JT, Insel TR. 2002 «The social deficits of the oxytocin knockout mouse». *Neuropeptides.*, vol. 36 no 2, p. 221-9.

Wobus AM, Kaomei G, Shan J, Wellner MC, Rohwedel J, Ji Guanju, Fleischmann B, Katus HA, Hescheler J, Franz WM. 1997. «Retinoic acid accelerates embryonic stem cell-derived cardiac differentiation and enhances development of ventricular cardiomyocytes». *J Mol Cell Cardiol.*, vol. 29, no 6, p.1525-39.

Wobus AM, Kleppisch T, Maltsev V, Hescheler J. 1994. «Cardiomyocyte-like cells differentiated in vitro from embryonic carcinoma cells P19 are characterized by functional expression of adrenoceptors and Ca^{2+} channels». *In Vitro Cell Dev Biol Anim.*, vol. 30, no 7, p.425-34.

Wu JP, Deschepper CF and Gardner DG. 1988. «Perinatal expression of the atrial natriuretic factor gene in rat cardiac tissue», *Am. J. Physiol.*, vol.255 , p.E388–E396.

Wu WX, Verbalis JG, Hoffman GE, Derks JB, Nathanielsz PW. 1996. «Characterization of oxytocin receptor expression and distribution in the pregnant sheep uterus». *Endocrinology*, vol. 137, no 2, p.722-8.

Xin X, Varlamov O, Day R, Dong W, Bridgett MM, Leiter EH, Fricker LD. 1997. «Cloning and sequence analysis of cDNA encoding rat carboxypeptidase D». *DNA Cell Biol.*, vol. 16, no 7, p.897-909.

Yang XD, Zhao LY, Zheng QS, Li X. 2003. «Effects of arginine vasopressin on growth of rat cardiac fibroblasts: role of V1 receptor». *J Cardiovasc Pharmacol.*, vol. 42, no 1, p.132-5.

Yoshimura R, Kimura T, Watanabe D, Kiyama H. 1996. «Differential expression of oxytocin receptor mRNA in the developing rat brain». *Neurosci Res.*, vol. 24, no 3, p.291-304.

Young WS 3rd, Shepard E, DeVries AC, Zimmer A, LaMarca ME, Ginns EI, Amico J, Nelson RJ, Hennighausen L, Wagner KU. 1998. «Targeted reduction of oxytocin expression provides insights into its physiological roles». *Adv Exp Med Biol.*, vol. 449, p.231-40.

Zagon IS, McLaughlin PJ. 2005. «Opioids and differentiation in human cancer cells». *Neuropeptides*, vol. 39, no 5, p.495-505.

Zheng SX, Bosch MA, Ronnekleiv OK. 2005. «mu-opioid receptor mRNA expression in identified hypothalamic neurons». *J Comp Neurol.*, vol. 487, no 3, p.332-44.


Zheng SX, Bosch MA, Ronnekleiv OK. 2005. «mu-opioid receptor mRNA expression in identified hypothalamic neurons». *J Comp Neurol.*, vol. 487, no 3, p.332-44.

Zhong M, Yang M, Sanborn BM. 2003. «Extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation by myometrial oxytocine receptor involves Galpha(q)Gbetagamma and epidermal growth factor receptor tyrosine kinase activation». *Endocrinology*, vol. 144, no 7, p.2947-56.

Zile MH. 2001. «Function of vitamin A in vertebrate embryonic development». *J Nutr.*, vol. 131, no 3, p.705-8.

Zingg HH, Laporte SA. 2003. «The oxytocin receptor». *Trends Endocrinol Metab.*, vol.14, no 5, p.222-7.

Zubrzycka M, Fichna J, Janecka A. 2005. «Inhibition of trigemino-hypoglossal reflex in rats by oxytocin is mediated by mu and kappa opioid receptors». *Brain Res.*, vol. 1035, no 1, p.67-72.

<p>(19)  Canadian Intellectual Property Office</p> <p><i>An Agency of Industry Canada</i></p>	<p>Office de la Propriété Intellectuelle du Canada</p> <p><i>Un organisme d'Industrie Canada</i></p>	<p>(11) CA 2 391 118</p> <p>(40) 21.12.2003</p> <p>(43) 21.12.2003</p>	<p>(13) A1</p>
---	---	---	-----------------------

(12)

(21) 2 391 118

(51) Int. Cl.⁷: **A61K 38/11, C12N 5/00, A61P 9/00**

(22) 21.06.2002

(71)

UNIVERSITE DU QUEBEC A MONTREAL,
Case Postale 8888
Succursale Centre-Ville, MONTREAL, Q1 (CA).

DANALACHE, BOGDAN A. (CA).
GUTKOWSKA, JOLANTA (CA).
PAQUIN, JOANNE (CA).
JANKOWSKI, MAREK (CA).

(72)

(74)

ROBIC

(54) **EMPLOI DE L'OXYTOCINE COMME INDUCTEUR DE MYOCARDIOGENESE ET UTILISATIONS CONNEXES**
 (54) **OXYTOCIN AS CARDIOMYOGENESIS INDUCER AND USES THEREOF**